



HAL
open science

Compréhension des premières étapes de nucléation de l'apatite biomimétique

Tristan Georges

► **To cite this version:**

Tristan Georges. Compréhension des premières étapes de nucléation de l'apatite biomimétique. Matériaux. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS068 . tel-04194598

HAL Id: tel-04194598

<https://theses.hal.science/tel-04194598>

Submitted on 3 Sep 2023

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.

Sorbonne Université

Physique et Chimie des Matériaux (ED397)

Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris / Equipe SMILES

Compréhension des premières étapes de nucléation de l'apatite biomimétique

Par Tristan Georges

Thèse de doctorat de Chimie

Dirigée par Thierry Azaïs

Présentée et soutenue publiquement le 03/02/2022

Devant un jury composé de :

Danielle Laurencin	Directrice de Recherche – ICGM, Montpellier	Rapportrice
Stephan Wolf	Professeur Junior – FAU, Erlangen	Rapporteur
Christophe Drouet	Directeur de Recherche – CIRIMAT, Toulouse	Examineur
Franck Fayon	Directeur de Recherche – CEMHTI, Orléans	Examineur
Nadine Nassif	Directrice de Recherche – LCMCP, Paris	Présidente du jury
Thierry Azaïs	Maître de Conférences – LCMCP, Paris	Directeur de thèse

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION GENERALE	13
CHAPITRE I – ETAT DE L’ART : MECANISME NON-CLASSIQUE DE FORMATION DE L’HYDROXYAPATITE	19
I. THEORIES DE LA NUCLEATION	23
1) Définitions et généralités	23
2) Théorie classique de la nucléation (CNT)	23
a) Nucléation homogène	24
b) Nucléation hétérogène	26
c) Croissance.....	27
d) Limites de la CNT	28
3) Exemples de mécanismes non-classiques	28
a) Généralités	28
b) L’exemple des carbonates de calcium	30
c) Autres systèmes	35
II. BIOMINERALISATION – DEFINITION ET GENERALITES	35
III. CAS DU TISSU OSSEUX	37
1) Généralités	37
2) La phase minérale : l’hydroxyapatite	38
3) Le collagène	46
4) Les protéines non-collagéniques.....	50
5) L’eau	52
6) Biominéralisation osseuse	53
a) Nucléation homogène	53
b) Nucléation hétérogène	53
c) Mécanisme non-classique de nucléation	54
d) Phénomène de maturation osseuse	55
IV. MODELES DE MINERALISATION <i>IN VITRO</i>	56
1) Modèles inorganiques	56
2) Influence des additifs organiques	57
3) Les espèces de prénucléation	60
V. CONCLUSION	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	63

CHAPITRE II : LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	77
I. GENERALITES.....	81
1) L'effet Zeeman.....	81
2) Le déplacement chimique	85
3) La relaxation	86
4) Sensibilité et rapport signal-sur-bruit.....	89
5) Avantages et inconvénients de la technique.....	90
II. LA RMN EN SOLUTION.....	91
1) Le mouvement brownien	91
2) Le couplage scalaire J	92
3) La quantitativité en RMN	94
4) Les phénomènes d'échanges chimiques	98
III. LA RMN A L'ETAT SOLIDE	99
1) Rotation à l'angle magique.....	100
2) Anisotropie de déplacement chimique	100
3) Interaction dipolaire.....	104
4) Séquences d'impulsion utilisées.....	106
a) Acquisition directe et découplage hétéronucléaire	106
b) Polarisation croisée CP	107
c) Hetcor et découplage homonucléaire.....	108
d) Recouplage homonucléaire basé sur la diffusion de spins (DARR).....	109
e) Recouplage homonucléaire basé sur la symétrie.....	111
f) Double CP et CP aller-retour	113
g) Recouplage hétéronucléaire (REDOR).....	114
5) Interaction quadripolaire	115
IV. LA RMN HYPERPOLARISEE PAR DNP.....	120
V. CONCLUSION	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125
CHAPITRE III – IMPACT DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX SUR LA QUANTITE ET LA STABILITE DES CLUSTERS DE PRENUCLEATION LORS LA FORMATION DE L'HYDROXYAPATITE.....	135
I. INTRODUCTION	139
II. ARTICLE 1 : EXPERIMENTAL FACTORS CONTROLLING PRENUCLEATION CLUSTERS PROPORTION AND LIFETIME DURING HYDROXYAPATITE FORMATION	141
III. CONCLUSION DE L'ARTICLE	174
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	176

CHAPITRE IV – EVOLUTION DE LA COMPOSITION IONIQUE DANS LE <i>SIMULATED BODY FLUID</i> (SBF)	179
I. INTRODUCTION	183
II. ARTICLE 2 : FORMATION AND EVOLUTION OF NANOSCALE CALCIUM PHOSPHATE PRECURSORS UNDER BIOMIMETIC CONDITIONS	185
III. CONCLUSION DE L'ARTICLE	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186
CHAPITRE V – CARACTERISATIONS STRUCTURALES DES CLUSTERS DE PRENUCLEATION IMPLIQUEES DANS LA FORMATION DE L'HYDROXYAPATITE « BIOMIMETIQUE »	189
I. INTRODUCTION	193
II. MATERIEL ET METHODES	194
1) Conditions de précipitation	194
2) Potentiométrie calcium et pH-métrie	194
3) RMN ³¹ P en solution	195
4) Cryo-TEM	195
5) DNP MAS ³¹ P sur solutions vitrifiées	195
6) DNP MAS ⁴³ Ca sur solutions vitrifiées	196
III. ETUDE STRUCTURALE DE COMPLEXES SOLUBLES DE Ca²⁺ PAR DNP MAS DU ⁴³Ca SUR DES SOLUTIONS VITRIFIEES	196
1) Introduction.....	196
2) Article 3 : ⁴³ Ca MAS DNP NMR of frozen solutions for the investigation of calcium ion complexation.....	197
3) Conclusion de l'article	225
IV. SUIVI TEMPOREL DE LA PRECIPITATION	226
1) Mesures potentiométriques de la précipitation	226
2) Suivi spectroscopique par RMN ³¹ P en solution	228
3) Rapports Ca/P et spéciation des phosphates.....	231
V. CARACTERISATION STRUCTURALE DES PNC PAR DNP MAS	233
1) ⁴³ Ca DNP MAS : applications aux PNC	233
2) ³¹ P DNP MAS.....	236
VI. CONCLUSION	245
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	247
CHAPITRE VI – CARACTERISATIONS STRUCTURALES DES PHASES TRANSITOIRES SOLIDES IMPLIQUEES DANS LA FORMATION DE L'HYDROXYAPATITE « BIOMIMETIQUE »	251
I. INTRODUCTION	255
II. MATERIEL ET METHODES	257

1)	Conditions de précipitation	257
2)	Potentiométrie calcium et pH-métrie	257
3)	RMN en solution.....	257
4)	Cryo-TEM	258
5)	Microscopie électronique en transmission (TEM).....	258
6)	RMN à l'état solide du noyau ³¹ P <i>ex situ</i> et cas spéciaux de CAP-1 et de CAP-2.	258
7)	RMN ³¹ P à l'état solide – autres solides et expériences ²³ Na— ³¹ P	259
8)	RMN ⁴³ Ca à l'état solide.....	259
9)	MAS-DNP ⁴³ Ca sur solutions vitrifiées	260
10)	Diffraction des rayons X	260
11)	Analyse thermogravimétrique (ATG)	260
III.	SUIVI TEMPOREL DE LA PRECIPITATION	260
1)	Rapports Ca/P et spéciation des phosphates.....	260
2)	Suivi spectroscopique par RMN ³¹ P à l'état solide	263
3)	Conclusion	266
IV.	CARACTERISATION DES ESPECES "POSTNUCLEATION"	267
1)	Clusters de postnucléation / CAP-1.....	267
2)	Phase transitoire / CAP-2	278
3)	Hydroxyapatite biomimétique	283
4)	Présence de sodium : contre-ion ou substitutions cationiques ?	289
V.	CONCLUSION	296
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	299
	CHAPITRE VII – ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'ACIDE POLYASPARTIQUE SUR LA MINERALISATION	
	D'HYDROXYAPATITE « BIOMIMETIQUE »	305
I.	INTRODUCTION	309
II.	MATERIELS ET METHODES	311
1)	Réaction de minéralisation.....	311
2)	Potentiométrie calcium et pH	313
3)	RMN en solution.....	314
4)	Cryo-TEM	314
5)	RMN à l'état solide	315
6)	MAS-DNP sur solutions vitrifiées.....	315
III.	COMPLEXATION DU CALCIUM.....	316
1)	Potentiométrie calcium	316

2)	RMN ⁴³ Ca en solution	317
IV.	INFLUENCE SUR LE MECANISME DE PRECIPITATION	319
1)	Potentiométrie du calcium.....	319
2)	Observations cryo-TEM	321
V.	LES INTERACTIONS AVEC L'ACIDE POLYASPARTIQUE.....	330
1)	La prénucléation.....	330
2)	Les réseaux de nanoparticules	333
3)	L'hydroxyapatite biomimétique	346
VI.	CONCLUSION	352
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	354
	CONCLUSION GENERALE	359
	ANNEXE – ARTICLE 2 : FORMATION AND EVOLUTION OF NANOSCALE CALCIUM PHOSPHATE PRECURSORS UNDER BIOMIMETIC CONDITIONS	365

Liste des abréviations

ACC	carbonate de calcium amorphe
ACP	phosphate de calcium amorphe
ATG	analyse thermogravimétrique
CP	polarisation croisée
cryo-TEM	cryomicroscopie électronique en transmission
CSA	anisotropie de déplacement chimique
DARR	dipolar assisted rotational resonance
DNP	polarisation dynamique nucléaire
DOLLOP	dynamically ordered liquid-like oxyanion polymers
DRX	diffraction des rayons X
FSLG	frequency-switched Lee Goldberg
FTIR	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GAGs	glycosaminoglycanes
HAP	hydroxyapatite
Hetcor	heteronuclear correlation
HPDEC	high power decoupling
HRTEM	microscopie électronique en transmission à haute-résolution
LP-TEM	microscopie électronique en transmission en phase liquide
LW / FWHM	largeur à mi-hauteur
MAS	rotation à l'angle magique
MW	microondes
OCP	phosphate octocalcique
pAsp	acide polyaspartique
PILP	polymer-induced liquid precursor

REDOR	rotational echo double resonance
RMN / NMR	résonance magnétique nucléaire
SBF	simulated body fluid
SIBLINGs	small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins
T_{amb} / T_{room}	température ambiante
t_{CP}	temps de contact
TEM	microscopie électronique en transmission
δ	déplacement chimique
ν_{ROT} / ν_{MAS}	fréquence de rotation

Introduction générale

La nucléation est le phénomène décrivant l'apparition d'une nouvelle phase locale, appelée noyau de taille critique, germe ou encore cluster, se développant à partir d'une ancienne phase moins stable. Elle englobe les phénomènes de transitions de phase telle que la cristallisation à partir de solutions. La théorie classique de la nucléation considère l'apparition des nouveaux germes comme stochastique et due à des fluctuations thermiques permettant de passer la barrière d'énergie nécessaire au passage d'un état métastable à stable. Dans le cas de la cristallisation, les nouveaux germes se forment à partir des ions en solution puis croissent par addition de monomères. Récemment, des écarts à ce modèle ont été observés dans de nombreux systèmes. Il s'avère que certains minéraux largement abondants dans le monde Vivant, tels que les carbonates de calcium, les phosphates de calcium, les oxalates de calcium, les sulfates de calcium ou encore les oxydes de fer (liste non exhaustive) suivent un mécanisme de cristallisation non-classique *in vitro* questionnant les mécanismes de biominéralisation de ces derniers *in vivo*.

Le mécanisme de formation du tissu osseux et particulièrement du minéral osseux, se situe au cœur de ces préoccupations et ne fait toujours pas l'objet d'un consensus au sein de la communauté scientifique. La fraction inorganique de l'os est majoritairement composée de nanoplaquettes d'hydroxyapatite (HAP), une phase de phosphate de calcium, orientées dans une matrice dense et fibrillaire de collagène de type I. La description de cette ultrastructure a permis de mettre en lumière l'intelligence de ce matériau et de scruter les actions coordonnées de toutes les composantes de la matrice extracellulaire contrôlées par les cellules osseuses. Cela confère au tissu osseux une organisation hiérarchique sur plusieurs échelles conduisant à ces propriétés mécaniques exceptionnelles. Tout au long de sa vie, le minéral osseux est contrôlé par les cellules osseuses, faisant l'objet d'un renouvellement permanent, le remodelage osseux, permettant de justifier son rôle de réservoir ionique. La densité de ce matériau et l'impossibilité d'observer en temps réel les zones de remodelage compliquent *de facto* l'interprétation du mécanisme de formation osseuse.

Par ailleurs, les études menées *in vivo* et *in vitro* semblent s'accorder quant à la complexité de sa formation. En effet, des phases de phosphates de calcium amorphes et cristallines (brushite, phosphate octocalcique...) ont été observées comme précédant la formation d'hydroxyapatite dans des systèmes *in vivo* et *in vitro*, suggérant un mécanisme de cristallisation en plusieurs étapes. De plus, l'observation récente, en 2010, de clusters de prénucléation a complexifié davantage les potentiels mécanismes de formation de phosphates de calcium, car les phases solides transitoires se formeraient à partir de ces clusters de manière non classique. Historiquement, des expériences de potentiométrie du calcium et des observations par cryomicroscopie électronique en transmission (cryo-TEM) ont permis de proposer leur existence et de les décrire comme étant solubles, de taille nanométrique et pouvant s'agréger en réseaux ramifiés de plusieurs centaines de nanomètres. Ces caractéristiques compliquent grandement leur étude, si bien que très peu d'études expérimentales s'intéressent à leur composition ou leur structure. Par ailleurs, l'utilisation de méthodes de modélisation s'avèrent d'une grande utilité pour étudier ces espèces, mais elles nécessitent de s'appuyer sur des données expérimentales solides afin d'être validées. Ainsi, le manque de données expérimentales concernant la composition et la structure ne permet pas à la littérature de s'accorder sur la nature de ces clusters de prénucléation à l'échelle atomique.

Quoi qu'il en soit, les avancées dans la compréhension du phénomène de minéralisation osseuse / de l'apatite nécessitent des approches pertinentes et une caractérisation structurale fine des différentes composantes minérales. En particulier, les axes de recherche à développer concernent :

- La formation des clusters de prénucléation
- La caractérisation structurale et dynamique des clusters de prénucléation
- La transition des phases amorphes nucléant à partir de précurseurs liquides
- Les mécanismes décrivant les transitions solide—solide
- L'influence des additifs à toutes les étapes de la précipitation
- La quantification de ces grandeurs à travers un modèle prenant en compte les aspects thermodynamiques et cinétiques en jeu

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte et s'intéresse particulièrement à la caractérisation des premières étapes de la formation *in vitro* d'hydroxyapatite dans des conditions proches de la physiologie. Nous nous sommes d'abord intéressés à l'étape de prénucléation en cherchant à développer des méthodologies expérimentales permettant de caractériser la dynamique, la structure et la composition des clusters de prénucléation et des espèces transitoires solides. Pour cela, nous avons privilégié l'utilisation de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), méthode permettant l'extraction de paramètres structuraux et dynamiques à l'échelle atomique, pour étudier nos solutions en cours de minéralisation.

Nous nous sommes appuyés sur cette méthode de caractérisation pour son aptitude à sonder sélectivement un ou plusieurs noyaux à l'échelle atomique. Différentes approches ont été utilisées, de la RMN en solution à la RMN à l'état solide en passant par la RMN hyperpolarisée du solide sur des solutions vitrifiées. Par ailleurs, nous avons cherché à réaliser des **caractérisations résolues dans le temps** afin d'obtenir des informations structurales et dynamiques inédites sur les espèces transitoires solubles ou non précédant la formation d'hydroxyapatite. En particulier, des études de la cinétique de précipitation et de la dynamique des clusters de prénucléation ont été réalisées par RMN en solution. La sensibilité étant le problème majeur de cette technique, nous avons notamment effectué des mesures à l'aide d'une cryosonde dans l'objectif d'avoir la meilleure résolution temporelle. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Dennis Kurzbach, professeur associé à l'Université de Vienne. Par ailleurs, les analyses structurales des différentes espèces transitoires ont été réalisées en utilisant la RMN du solide. Les clusters de prénucléation ont été caractérisés par RMN du solide à basse température ($\approx 100\text{K}$) couplée à l'hyperpolarisation (MAS-DNP) de manière à s'affranchir des difficultés liées à leur caractère soluble, leur dynamique et leur faible concentration. Les expériences de MAS-DNP ont été réalisées en collaboration avec Giulia Mollica, directrice de recherche à l'Institut de Chimie Radicalaire à l'Université d'Aix-Marseille, et avec Nicolas Birlirakis, ingénieur de recherche au Laboratoire des Biomolécules localisé à l'École Normale Supérieure de Paris.

Nous avons ensuite complété nos résultats avec des études par potentiométrie du calcium et suivi du pH et nous avons procédé à des observations par cryo-TEM, méthodes déjà exploitées dans la littérature pour étudier les clusters de prénucléation et les phénomènes non-classiques. La potentiométrie du calcium nous a permis d'accéder à des analyses cinétiques et aux proportions d'ions calcium liés au cours du temps. Le suivi du pH a été exploité pour étudier les états de protonation des ions phosphates au cours du temps. Enfin, les observations par cryo-TEM, réalisées par Jean-Michel Guigner, ingénieur d'études à l'IMPMC (Sorbonne Université) ont permis d'observer les différentes espèces transitoires dans leur état natif à des temps bien définis.

L'existence des clusters de prénucléation a pu être rationalisée en fonction de divers paramètres et leur composition chimique a pu être obtenue *via* des méthodes inédites. Nous avons

ensuite étudié l'influence d'un additif organique mimant l'action des protéines acides *in vivo*, l'acide polyaspartique, sur tous les aspects de la précipitation de l'hydroxyapatite. En particulier, les interactions organo-minérales ont été déterminées dans notre système.

L'ensemble de ces expériences nous ont permis de mieux comprendre le mécanisme de cristallisation de l'hydroxyapatite, et ce, dès ses premières étapes dont la prénucléation. Nos études permettent d'apporter de nombreuses données expérimentales à la littérature, cruciales à la compréhension de ces phénomènes non-classiques. Dans ce manuscrit, nous résumons nos concepts et résultats en **sept chapitres** de la manière suivante :

- Le **chapitre I** décrit les notions générales relatives aux mécanismes de cristallisation appliqués à la minéralisation de l'hydroxyapatite et à la biominéralisation du tissu osseux.
- Le **chapitre II** décrit les concepts généraux propres à la spectroscopie RMN. Les méthodologies et séquences d'impulsion utilisées dans ce manuscrit sont notamment détaillées.
- Le **chapitre III** s'intéresse à l'influence des paramètres expérimentaux sur la cinétique de précipitation et en particulier sur la proportion et le temps de vie des clusters de prénucléation. Une composition chimique moyenne des clusters de prénucléation est proposée sur la base de données potentiométriques et spectroscopiques. Ce chapitre se présente sous la forme d'un article scientifique.
- Le **chapitre IV** s'intéresse au Simulated Body Fluid (SBF), une solution métastable mimant la composition ionique du plasma sanguin. Nos résultats indiquent que des espèces de prénucléation se forment sur une durée de 24h après la préparation de la solution et qu'elles ont une composition similaire aux clusters de prénucléation trouvés dans des solutions minéralisantes du chapitre III. Ce chapitre se présente aussi sous la forme d'un article scientifique réalisé en collaboration avec l'équipe de Dennis Kurzbach.
- Le **chapitre V** est dédié à la caractérisation des espèces de prénucléation par MAS-DNP sur solutions vitrifiées. Pour ce faire, nous avons sélectionné une condition de précipitation, puis nous avons réalisé des expériences de RMN du solide sur des solutions en cours de précipitation fixées à des températures cryogéniques, permettant ainsi de stopper leur évolution et de caractériser la structure des intermédiaires réactionnels solubles en temps résolu. Cette approche a été expérimentée sur les noyaux ^{31}P et ^{43}Ca . L'étude du noyau ^{43}Ca a par ailleurs nécessité un développement méthodologique sur des solutions de référence. Elle a par conséquent fait l'objet d'un article scientifique réalisé en collaboration avec l'équipe de Giulia Mollica.
- Le **chapitre VI** est dédié à l'analyse structurale des phases transitoires solides post-nucléation et précédant la formation d'hydroxyapatite.
- Le **chapitre VII** vise à étudier le rôle de l'acide polyaspartique, mimant l'action des protéines acides, sur la minéralisation d'hydroxyapatite. Nous croisons notamment nos observations par cryo-TEM avec des expériences de RMN *in situ*. Le mode d'interaction entre l'additif organique et la phase minérale sont notamment mis en évidence par des expériences de recouplage dipolaire ^{13}C - ^{31}P .

Chapitre I – Etat de l’art : mécanisme non-classique de formation de l’hydroxyapatite

CHAPITRE I – ETAT DE L’ART : MECANISME NON-CLASSIQUE DE FORMATION DE L’HYDROXYAPATITE	19
I. THEORIES DE LA NUCLEATION	23
1) Définitions et généralités	23
2) Théorie classique de la nucléation (CNT)	23
a) Nucléation homogène	24
b) Nucléation hétérogène	26
c) Croissance.....	27
d) Limites de la CNT	28
3) Exemples de mécanismes non-classiques	28
a) Généralités	28
b) L’exemple des carbonates de calcium	30
c) Autres systèmes	35
II. BIOMINERALISATION – DEFINITION ET GENERALITES	35
III. CAS DU TISSU OSSEUX	37
1) Généralités	37
2) La phase minérale : l’hydroxyapatite	38
3) Le collagène	46
4) Les protéines non-collagéniques	50
5) L’eau	52
6) Biominéralisation osseuse	53
a) Nucléation homogène	53
b) Nucléation hétérogène	53
c) Mécanisme non-classique de nucléation	54
d) Phénomène de maturation osseuse	55
IV. MODELES DE MINERALISATION <i>IN VITRO</i>	56
1) Modèles inorganiques	56
2) Influence des additifs organiques	57
3) Les espèces de prénucléation	60
V. CONCLUSION	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	63

I. Théories de la nucléation

1) Définitions et généralités

La nucléation est le processus décrivant la formation d'une nouvelle phase thermodynamiquement stable à partir d'une ancienne phase. Elle se traduit énergétiquement par le passage d'une structure possédant une haute énergie libre à une structure présentant une énergie libre plus faible. D'après cette définition, le concept de nucléation peut s'appliquer à divers systèmes de transitions de phases, telles que la cristallisation¹, la fusion, l'ébullition ou la condensation¹⁻⁴.

Par exemple, la nucléation est à l'origine de divers événements naturels tels que les éruptions volcaniques, les chutes de neige, de pluies... De même, elle est à l'origine de certaines maladies neuro-dégénératives⁵. Bien entendu, elle est à l'origine du phénomène de cristallisation et, de ce fait, est essentielle aux phénomènes de biominéralisation qui seront développés plus loin dans ce chapitre. De ce fait, la nucléation demeure un phénomène important à considérer dans beaucoup de champs de recherche telles que la chimie organique et inorganique, les sciences environnementales ou encore les sciences du vivant. Néanmoins, son étude est délicate, car elle implique une description atomique/moléculaire des premiers noyaux nucléés dont la taille et la cinétique de formation sont difficiles à observer par des techniques expérimentales et à prédire, ou modéliser par des simulations.

On distingue généralement 2 types de nucléation : la nucléation homogène et la nucléation hétérogène. La nucléation homogène correspond au passage d'un système métastable à un système stable induit par des fluctuations thermiques. Elle ne considère pas l'implication de surfaces extérieures ou d'additifs, c'est-à-dire que la nucléation apparaît dans le volume de la phase originelle. Il s'agit par exemple du mécanisme dominant dans le cas de la formation de céramiques microcristallines⁶ ou d'explosions liées à l'introduction d'un fluide froid dans un fluide chaud⁷. A priori, il s'agirait aussi du mécanisme dominant la formation de carbonates et de phosphates de calcium en conditions purement inorganiques⁸. A l'inverse, la nucléation hétérogène considère les effets de surface qu'ils soient involontaires (parois des contenants, défauts, poussières et impuretés) ou volontaires. C'est d'ailleurs le premier cas qui permet d'expliquer la production accrue de bulles lorsqu'on verse du champagne dans un verre⁹. Dans le deuxième cas, on introduit généralement une surface permettant d'abaisser l'énergie nécessaire à former la nouvelle phase. Par exemple, l'introduction d'un cheveu ou d'un poil animal dans une solution permet d'augmenter la vitesse de nucléation de cristaux¹⁰. Les cheveux présentent une surface ordonnée, la cuticule, permettant de piéger les noyaux nouvellement formés menant à une cristallisation accélérée de ces derniers.

Pour tenter de rationaliser et de quantifier les phénomènes liés à la nucléation, les scientifiques ont développé un modèle thermodynamique appelé la théorie classique de la nucléation, ou CNT (Classical Nucleation Theory).

2) Théorie classique de la nucléation (CNT)

La théorie classique de la nucléation s'appuie sur la description thermodynamique de systèmes hétérogènes originellement proposée par Gibbs¹¹. Le traitement quantitatif de la CNT a été développé entre 1926 et 1946 par les travaux successifs de Volmer et Weber¹², de Becker et Döring¹³ et de Frenkel^{14,15}, entre autres. La théorie a premièrement été développée en s'intéressant à la formation

de noyaux liquides provenant de la condensation de vapeurs d'eau, puis a été étendue aux autres transitions de phases dont la nucléation de cristaux solides en solution.

a) Nucléation homogène

Considérons un liquide dont les conditions de température et de concentrations sont favorables à une transition de phase telle que la cristallisation. Le système est dit « en sursaturation » et se traduit par le passage d'un état métastable à stable, plus stable énergétiquement (Figure 1). Dans le cas d'une cristallisation, la sursaturation $\Delta\mu$ représente la force motrice de la transition de phase et peut s'exprimer telle que $\Delta\mu = kT \ln \frac{C}{C_s}$, où T est la température, C est la concentration et C_s la solubilité.

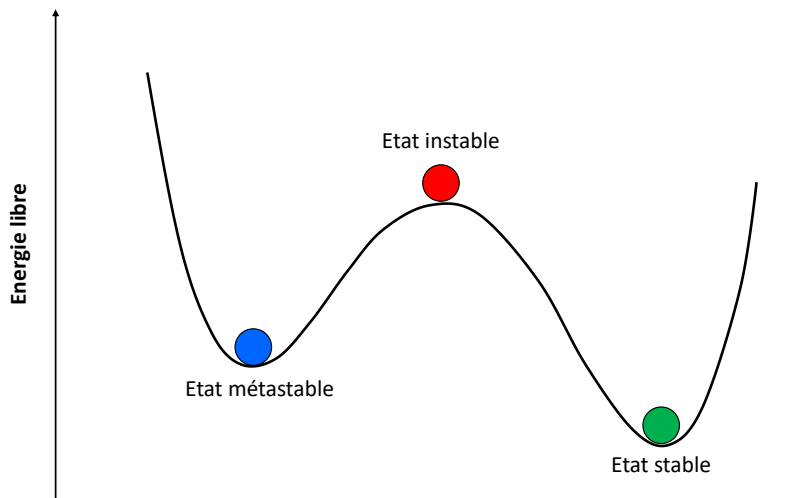


Figure 1 : Représentation schématique des états métastable, instable et stable.

Dans une telle solution, les molécules d'une espèce dissoute diffusent de manière aléatoire. Certaines molécules finissent inévitablement par entrer en collision. Il en résulte la formation stochastique de noyaux, aussi appelés « germes » ou « clusters ». Dans la CNT, les noyaux constitués de n molécules sont considérés comme étant homogènes et sphériques de rayon r , et possèderaient les mêmes propriétés que la phase finale dans son volume : il s'agit de l'approximation capillaire. Énergétiquement parlant, le processus de nucléation met en jeu l'énergie libre ΔG qui résulte de la compétition entre l'énergie volumique, favorable à la création d'une nouvelle phase ΔG_v , et la création d'une interface défavorable énergétiquement ΔG_s . On a :

$$\Delta G = \Delta G_v + \Delta G_s = -\frac{4\pi r^3 \Delta\mu}{3\Omega} + 4\pi r^2 \gamma, \quad (1)$$

où Ω est le volume moléculaire et γ la tension superficielle (en J/m^2) et représente l'énergie nécessaire à la création d'une surface. Comme on peut le constater, les contributions volumiques et surfaciques s'opposent en signe. Il en résulte que pour créer un noyau stable, une barrière énergétique ΔG^*_{hom} doit être atteinte (Figure 2). En d'autres termes, le germe formé sera stable s'il a une taille r^* , telle que $r^* = \frac{2\Omega\gamma}{\Delta\mu}$. On peut alors exprimer la barrière d'énergie telle que :

$$\Delta G^*_{\text{hom}} = \frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3\Delta\mu^2} \quad (2)$$

On appelle ce germe particulier le « noyau de taille critique ». Lorsque la taille du noyau est proche de r^* , le germe est en équilibre instable et on distingue 2 cas :

- $r < r^*$: le noyau se dissout pour minimiser son énergie libre.
- $r > r^*$: le noyau croît.

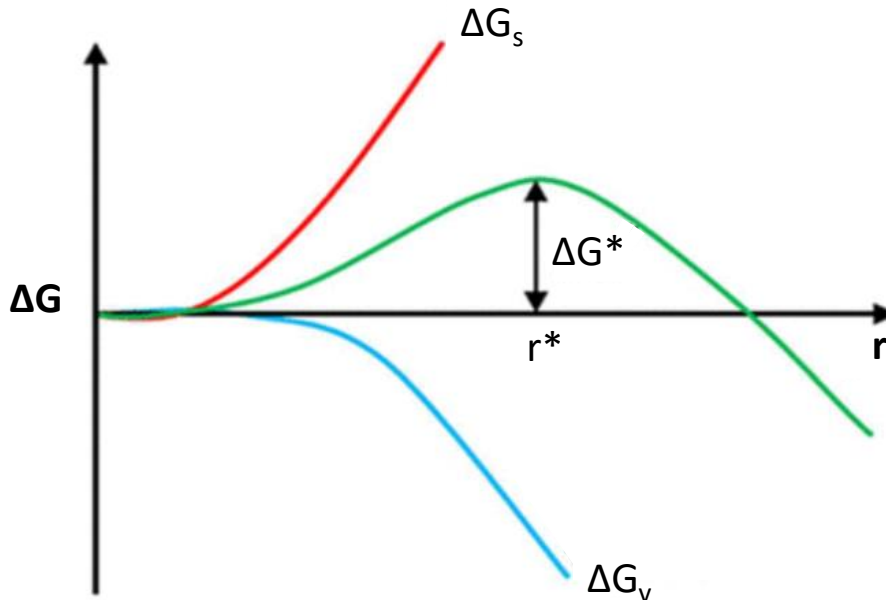
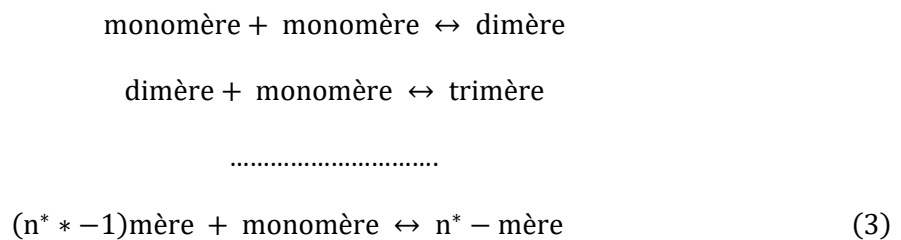


Figure 2 : Compétition des contributions énergétiques surfaciques et volumiques dans le cadre de la nucléation homogène en fonction du rayon du noyau. Figure reproduite d’après Karthika *et al.*¹⁶

Concrètement, la taille du noyau critique dépend du niveau de sursaturation, qui dépend de la solubilité de la phase formée et de la température. Ajoutons que la solubilité varie elle-même en fonction de la température. Généralement, la sursaturation s’obtient par refroidissement ou chauffage de la solution selon la dépendance directe ou inverse de la concentration avec la température. Dans le cas où dépendance de la solubilité à la température est faible, on peut obtenir la sursaturation en évaporant le solvant. Les réactions chimiques, de précipitation par exemple, impliquant le soluté et une autre espèce et conduisant à un produit faiblement soluble, peuvent aussi permettre d’atteindre la sursaturation.

La CNT permet aussi d’appréhender les considérations cinétiques de la nucléation. L’approche considère que la formation d’un noyau critique suit un mécanisme stochastique d’addition d’un atome ou d’une molécule à une autre jusqu’à atteindre la taille critique telle que :



où n^* est le nombre de monomères nécessaire à atteindre pour former le noyau de taille critique. La formation d'un noyau critique dépend ainsi de la fréquence d'incorporation d'un monomère au noyau critique β_k . Le nombre de noyaux critiques n_k suit une distribution de Boltzmann et la vitesse de nucléation J peut s'exprimer telle que :

$$J = Z\beta_k n_k = Z\beta_k n_1 \exp\left(\frac{-\Delta G_{\text{hom}}^*}{kT}\right) = Z\beta_k n_1 \exp\left(\frac{-16\pi\Omega^2\gamma^3}{3\Delta\mu^2 kT}\right), \quad (4)$$

où Z est le facteur de Zeldovich et vaut environ 10^{-2} . Ce terme traduit qu'un noyau de taille critique formé peut se dissoudre, menant à un nombre réduit de noyaux formés¹⁷. On constate que la vitesse de nucléation dépend aussi du niveau de sursaturation.

b) Nucléation hétérogène

La nucléation hétérogène peut être formalisée par les mêmes principes que la nucléation homogène par la CNT. Néanmoins, dans ce cas, les germes se forment préférentiellement sur la surface d'un substrat (parois, défauts, poussières, additifs...) plutôt que dans la phase initiale homogène. Le germe formé n'est plus considéré sphérique mais comme une fraction de sphère. D'un point de vue thermodynamique, l'énergie nécessaire à la formation est moindre et considère les hypothèses suivantes :

- La forme du noyau est une portion de sphère.
- La taille du substrat est grande devant celle du germe.
- La surface du substrat est considérée plane au niveau de l'interface noyau—substrat.
- Le substrat est indéformable.

Sans rentrer dans les détails, la CNT permet alors de calculer l'énergie libre de formation du noyau critique ΔG_{het}^* en fonction de l'angle de mouillage α traduisant l'affinité du noyau pour le substrat telle que :

$$\Delta G_{\text{het}}^* = \Delta G_{\text{hom}}^* \left(\frac{1}{2} - \frac{3}{4} \cos\alpha + \frac{1}{4} \cos^3\alpha \right) \quad (5)$$

Dans cette équation, nous remarquons que l'énergie libre de formation d'un noyau critique est bien souvent plus faible dans le cas de la nucléation hétérogène que la nucléation homogène. On peut rationaliser ce modèle selon 3 cas (Figure 3) :

- $\alpha = 180^\circ$: le germe n'a pas d'affinité avec le substrat. On parle d'une absence de mouillage et dans ce cas, l'énergie nécessaire à la formation d'un noyau de taille critique est la même que dans la nucléation homogène.
- $\alpha = 90^\circ$: l'affinité du germe avec le substrat est telle que le germe doit adopter une géométrie de demie sphère. Énergétiquement parlant, l'énergie nécessaire à la formation d'un tel noyau correspond à la moitié de celle nécessaire dans le cas d'une nucléation homogène
- $\alpha \rightarrow 0^\circ$: on parle d'un mouillage parfait. Dans ce cas, le support catalyse la nucléation abaissant de manière drastique la barrière énergétique à franchir pour former un germe de taille critique.

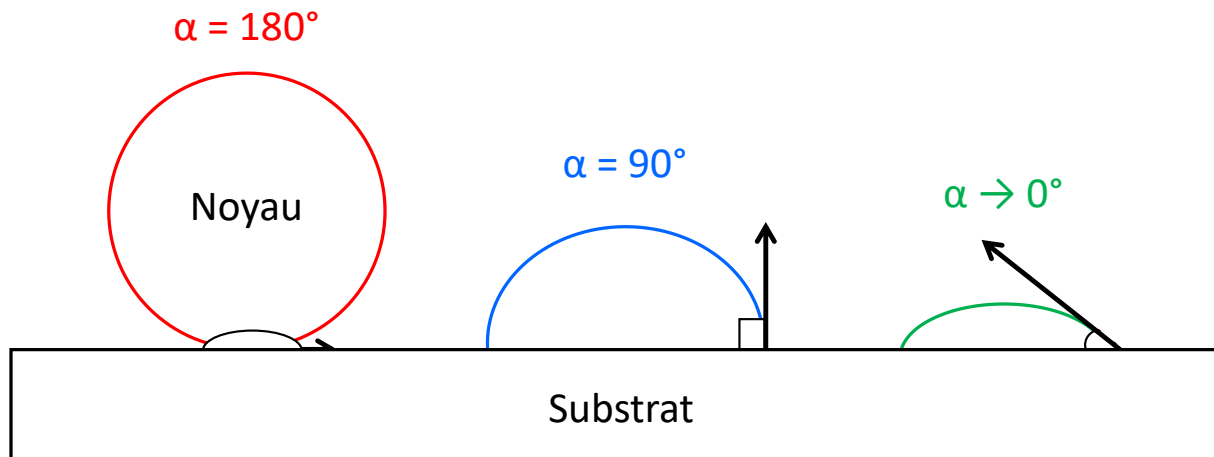


Figure 3 : Influence de l'angle de mouillage sur la géométrie du noyau formé. Image reproduite d'après Lafferrere¹⁸.

D'un point de vue cinétique, il faut considérer 2 cas :

- la polynucléation instantanée dans laquelle N noyaux se forment au même moment.
- la polynucléation progressive décrivant la formation de N noyaux se formant de manière continue au cours du temps.

Si dans la polynucléation instantanée, tous les noyaux ont la même taille à un instant donné, ce n'est pas le cas de la polynucléation progressive. Il faut dans ce cas considérer le taux de recouvrement d'un noyau à l'autre, ce qui est relativement complexe à quantifier. La CNT permet d'estimer la vitesse de nucléation J dans le cas de la nucléation hétérogène. Cependant, nous ne développerons pas cette partie plus en détails, car ces concepts ne seront pas exploités dans le cadre de cette thèse.

c) Croissance

Le germe critique est formé de monomères qui peuvent être des atomes, des ions ou des molécules que l'on généralise sous le terme de monomère. La CNT prédit, qu'on soit dans le cas d'une nucléation homogène ou hétérogène, qu'une fois le noyau de taille critique formé, celui-ci est thermodynamiquement favorable à croître. A cet instant, l'énergie libre est négative car le gain d'énergie volumique compense la perte d'énergie nécessaire à la création d'interfaces. La croissance de ce dernier implique l'addition de monomères à la surface du noyau de taille critique jusqu'à former un cristal de volume défini. Bien que la structure d'un cristal soit reliée à la maille cristalline, un même matériau peut cristalliser sous différentes morphologies. Ce comportement est dû aux différences d'énergie de surface des différentes faces du cristal et à l'environnement autour du cristal. A cela s'ajoutent une compétition entre phénomènes thermodynamiques et cinétiques et d'éventuels processus de murissement d'Ostwald (croissance préférentielle des grosses particules avec dissolution des petites particules) pouvant conduire à différentes morphologies (Figure 4). Ces concepts ne seront pas plus développés ici, car le contenu de cette thèse s'intéresse principalement à l'étape de nucléation.

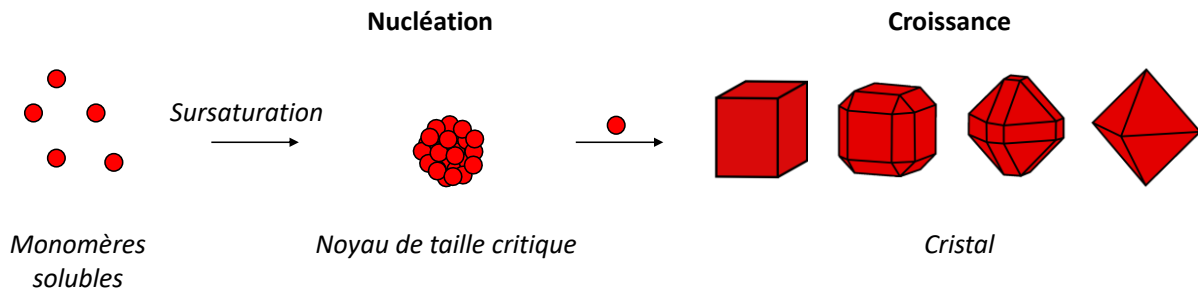


Figure 4 : Schéma récapitulatif de la CNT et de la croissance par ajout de monomère.

d) Limites de la CNT

Les limitations de la CNT sont précisément basées sur les hypothèses décrivant l'approximation capillaire, parmi lesquelles :

- Le noyau formé a les mêmes propriétés (densité, structure, composition) que le cristal final.
- Le noyau est sphérique.
- L'interface noyau—solution est quasi nulle et plane.

Concrètement, l'approximation capillaire peut s'avérer raisonnable pour des noyaux grands mais pour de petits clusters, l'interface est fortement courbée. De plus, nombre de systèmes ne nucléent pas sous la forme de particules sphériques : NaCl, par exemple, produit des noyaux cubiques. Il découle de ces simplifications que la CNT échoue bien souvent à décrire quantitativement le phénomène de nucléation, parfois de plusieurs ordres de grandeur^{19,20}. Si le traitement quantitatif de la CNT est bien souvent inexact, elle permet toutefois d'appréhender qualitativement les phénomènes de nucléation dans bien des cas.

Cependant, il a été observé dans certains systèmes qu'une phase métastable passant par un minimum local d'énergie, nucléait préalablement au détriment de la phase stable. La CNT ne prend pas en compte les phénomènes impliquant différentes espèces transitoires précédant la formation de la phase stable : par exemple, un polymorphe moins stable doit se former, la CNT prédit qu'elle se formera directement. Ces mécanismes de cristallisation sont qualifiés de « non-classiques ».

3) Exemples de mécanismes non-classiques

a) Généralités

Les principes non-classiques, par définition, s'opposent à la théorie classique de la nucléation. En particulier, il convient de distinguer les mécanismes de nucléation et de cristallisation non-classiques. La nucléation non-classique concerne la formation de clusters de prénucléation thermodynamiquement stables, en opposition avec le noyau de taille critique dans la CNT. Ces clusters ont récemment été découverts et seront discutés plus en détail *i)* dans la sous-partie suivante dans le cas de la nucléation des carbonates de calcium, et *ii)* tout au long de ce manuscrit dans le cadre de la

cristallisation d'hydroxyapatite. Les phénomènes de cristallisation non-classique sont surtout observés dans les systèmes impliquant des phases transitoires cristallisant par attachement de particules plutôt que par addition de monomères jusqu'à former la phase thermodynamiquement stable. Précisons que ces mécanismes de cristallisation non-classiques peuvent inclure plusieurs étapes et plusieurs espèces transitoires (Figure 5). Ces espèces intermédiaires peuvent être :

- Des complexes multi-ioniques^{21,22}
- Des oligomères ou clusters²³
- Des phases de liquide dense²⁴
- Des nanoparticules amorphes^{25,26}
- Des nanoparticules cristallines²⁷

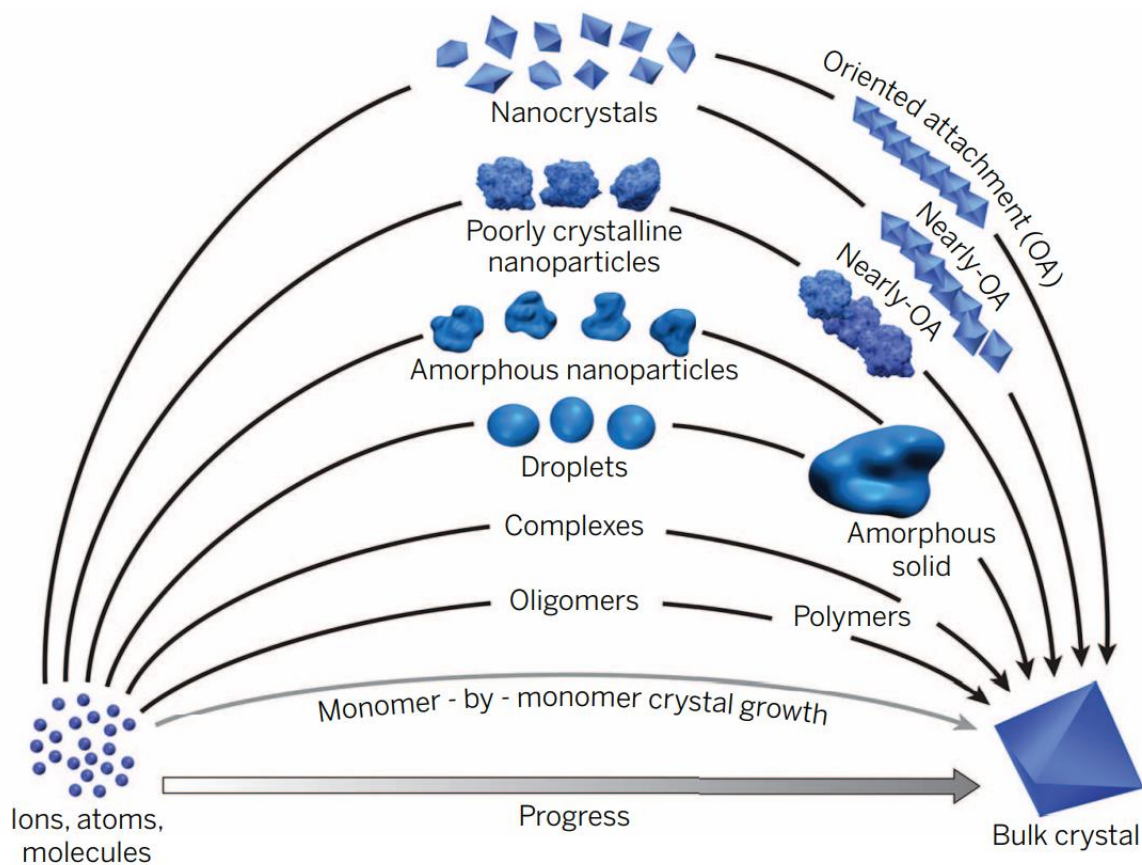


Figure 5 : Mécanismes de cristallisation par attachement de particules. Image reproduite selon de Yoreo *et al.*²⁸.

Une fois ces espèces transitoires formées, elles s'assemblent de manière contrôlée pour former la phase suivante ou finale. Ces phases de croissance diffèrent une nouvelle fois de la CNT considérant le murissement d'Ostwald. Nous pouvons citer par exemple la croissance par attachement orienté ou la formation de mésocristaux. Ces phénomènes sont relativement bien décrits dans la revue de Niederberger et Cölfen²⁹. Brièvement, l'attachement orienté décrit l'auto-assemblage spontané de particules adjacentes partageant une orientation cristallographique commune suivi de leur fusion en tant que monocristal (Figure 6A). Les mésocristaux sont des cristaux colloïdaux composés de

nanocristaux individuels s'alignant de manière cohérente d'un point de vue cristallographique (Figure 6B).

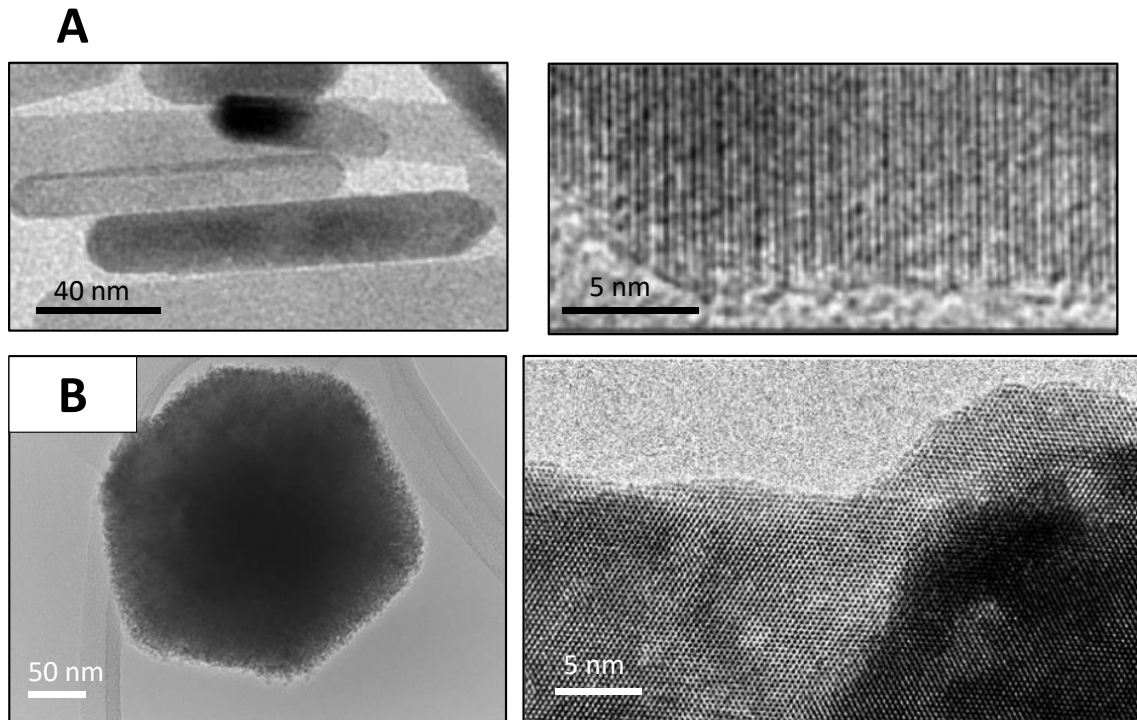


Figure 6 : (A) Exemple d'attachement orienté dans des nanobâtonnets de ZnO. Gauche : cliché TEM (Transmission Electron Microscopy) ; droite = cliché HRTEM (High Resolution TEM). (B) Exemple de mésocristal de SrTiO₃. Gauche : cliché TEM ; droite = cliché HRTEM. (A) et (B) sont respectivement reproduits d'après Pacholski *et al.*³⁰ et Calderone *et al.*³¹.

Ajoutons que les mécanismes non-classiques de nucléation et de cristallisation peuvent être décorrélés, à savoir qu'un système peut nucléer de manière non-classique et cristalliser de manière classique, et inversement. Dans les prochains paragraphes, ces principes seront explicités sous la forme d'exemples observés dans la littérature dans des systèmes transposables aux phénomènes de biominéralisation, thème important de ce travail doctoral.

b) L'exemple des carbonates de calcium

Les organismes précipitant du carbonate de calcium CaCO₃ sont très abondants dans le monde vivant. Il est surtout sécrété en tant qu'exosquelette par les invertébrés marins³², mais on le retrouve aussi dans les plantes³³. La cristallisation de ce biominéral passe très souvent par un intermédiaire amorphe, le carbonate de calcium amorphe ou ACC (Amorphous Calcium Carbonate) qui cristallise ensuite en trois polymorphes (même composition chimique mais cristallisation sous la forme d'une structure cristallographique différente) : la calcite, l'aragonite et la vaterite. La calcite est la phase thermodynamiquement la plus stable, mais il est courant de retrouver des formes stabilisées de l'ACC, de la vaterite et de l'aragonite *in vivo*³⁴. Les carbonates de calcium ont donc beaucoup été étudiés dans l'objectif d'en savoir plus sur les phénomènes de biominéralisation et de mécanismes non-classiques. L'étude de modèles *in vitro* a permis de mettre en évidence des mécanismes de nucléation et de croissance non-classiques versatiles et complexes en termes de phases ne pouvant pas être

explicitement décrites par la CNT^{8,35}. Dans les prochains paragraphes, nous décrivons succinctement de manière non-exhaustive les phénomènes non-classiques détectés dans la minéralisation de CaCO₃.

La première phase intervenant dans la nucléation de CaCO₃ est le cluster de prénucléation ou PNC (PreNucleation Cluster), premièrement détecté par Gebauer *et al.*²¹ relativement récemment, en 2008. Par ajout contrôlé d'une solution de calcium dans une solution de carbonate, des mesures par potentiométrie du calcium ont permis de détecter qu'une partie des ions calcium était liée avant la nucléation. Si la nucléation (indiquée par des flèches dans la Figure 7) indique qu'il y a bien une barrière d'énergie à franchir, les clusters de prénucléation se forment même dans des solutions en sous saturation, ce qui est contraire aux principes de la CNT. Tant que la nucléation n'est pas atteinte, des expériences de dilution du calcium ou de variations du pH ont permis de montrer le caractère réversible de la formation de ces clusters, ce qui prouve qu'ils sont stables (ou métastables) au sens thermodynamique. Il s'agit d'une deuxième entorse à la CNT dans laquelle la formation d'un noyau est instable. Enfin, ces clusters doivent être considérés comme des espèces solubles car la formation d'un solide se traduit par un équilibre de solubilité que l'on peut observer après la nucléation. Cependant, ce n'est pas observé dans le domaine temporel d'existence des clusters de prénucléation, signifiant qu'une interface n'est pas créée.

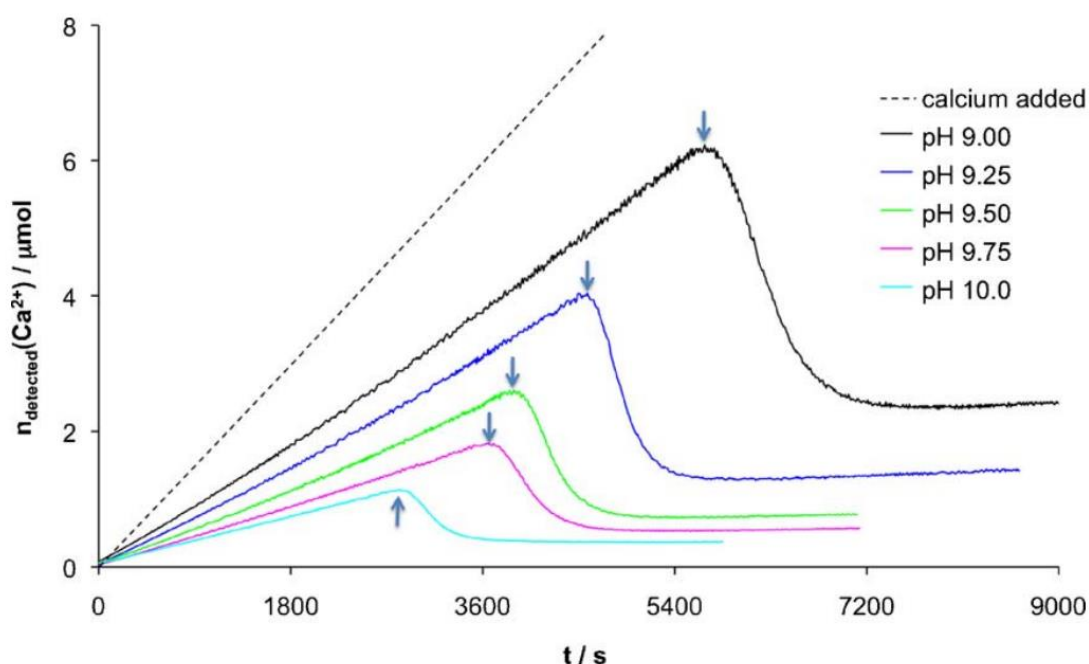


Figure 7 : Expériences de potentiométries calcium mettant en évidence l'existence de clusters solubles de prénucléation. Figure reproduite d'après Gebauer *et al.*²¹.

Des expériences d'ultracentrifugation ont permis de distinguer ces 2 populations ioniques (les PNC et les ions libres) par leur coefficient de sédimentation (Figure 8A). Cela a permis d'affirmer leur caractère moléculaire soluble³⁶. Leur densité a été estimée inférieure à celle de l'ACC issu de la nucléation, impliquant le caractère hydraté des PNC⁸.

Par ailleurs, cela a permis d'estimer leur taille moyenne à environ 2 nm, ce qui a été vérifié par cryo-TEM (Figure 8B) par Pouget *et al.*³⁷ Cette dernière étude s'intéressait à la nucléation localisée de nanoparticules d'ACC par l'utilisation d'une monocouche d'acide stéarique et a permis de différencier

plusieurs populations de PNC d'environ 1 nm et 4 nm en tailles. Cette étude suggère que la nucléation d'ACC est issue de l'agrégation de PNC. Des simulations ont en effet proposé que les PNC s'agrégeaient par alternance d'ions calcium et carbonates et pouvant former des chaînes linéaires, branchées ou circulaires flexibles. De manière intéressante, ces structures seraient encore considérées solubles, c'est pourquoi elles ont été appelées DOLLOP (Dynamically Ordered Liquid-Like Oxyanion Polymers)²³. **Dans le reste de ce manuscrit, les PNC et leurs agrégats encore solubles seront respectivement appelés « espèces de prénucléation » et « PNS » (pour PreNucleation Species).** Ainsi, la découverte de ces PNC est apparue comme une nouveauté dans les phénomènes de cristallisation, car elles représentent une entorse à la CNT avant même la nucléation.

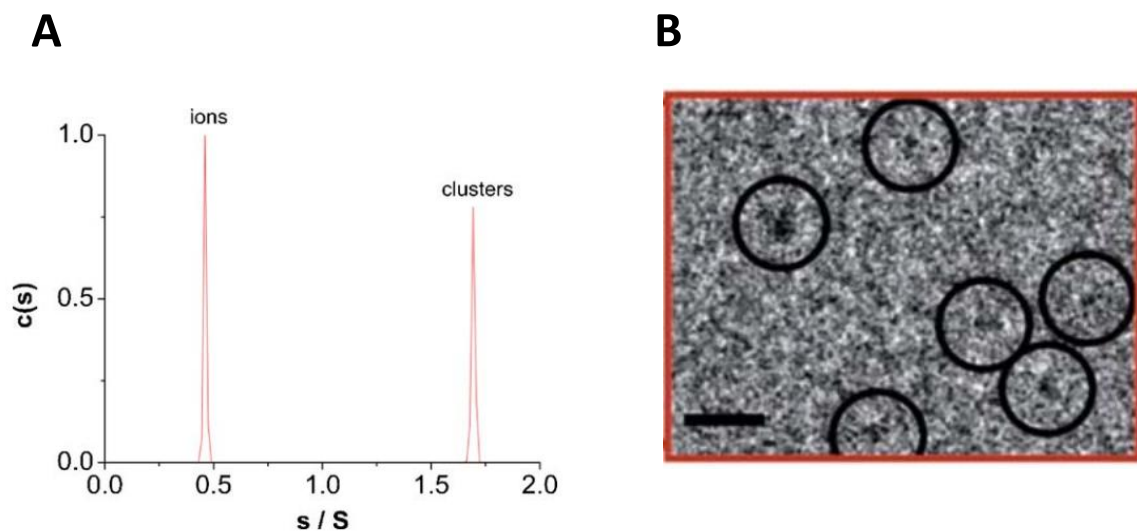


Figure 8 : (A) Distinction des PNC et des ions libres par leur coefficient de sédimentation. (B) Première observation des PNC par cryo-TEM. Figures respectivement reproduites d'après Gebauer *et al.*²¹. et Pouget *et al.*³⁷.

Par ailleurs, cette étude démontre que les espèces de prénucléation peuvent interagir avec des additifs organiques menant à la nucléation hétérogène d'ACC, ce qui a été appuyé par des études récentes s'intéressant à des additifs de différentes tailles^{38,39}. Plus particulièrement, la présence de ces additifs, généralement des polymères organiques acides (choisis car mimant les protéines acides trouvées *in vivo*), induit la formation d'une phase liquide amorphe, appelée « PILP » (pour Polymer-Induced Liquid Precursor). Il s'agit d'une phase de liquide dense premièrement notifiée par Gower *et al.*²⁴ présente sous la forme de gouttelettes de tailles variables (plusieurs centaines de nm à plusieurs μm). D'autre part, ces gouttelettes ont aussi été observées (Figure 9A) en l'absence d'additifs organiques⁴⁰⁻⁴² suggérant que l'additif organique n'induit pas la formation de cette phase, mais la stabiliserait par effet de pH ou en agissant localement sur les concentrations ioniques (typiquement en séquestrant des ions calcium). L'agrégation des PNC, assistée ou non par des additifs organiques peut mener alors à une séparation de phase liquide—liquide de type décomposition binodale ou spinodale^{43,44} (Figure 9B). Ces phénomènes peuvent être observés dans des systèmes liquides dans lesquels une sursaturation est présente et favorable à la nucléation d'une seconde phase liquide. Dans le cas des carbonates de calcium, l'hypothèse d'une décomposition binodale ne peut pas être décrite par la CNT car elle serait induite par une agrégation de PNC stables, plutôt que par un mécanisme stochastique métastable ou instable⁴⁵.

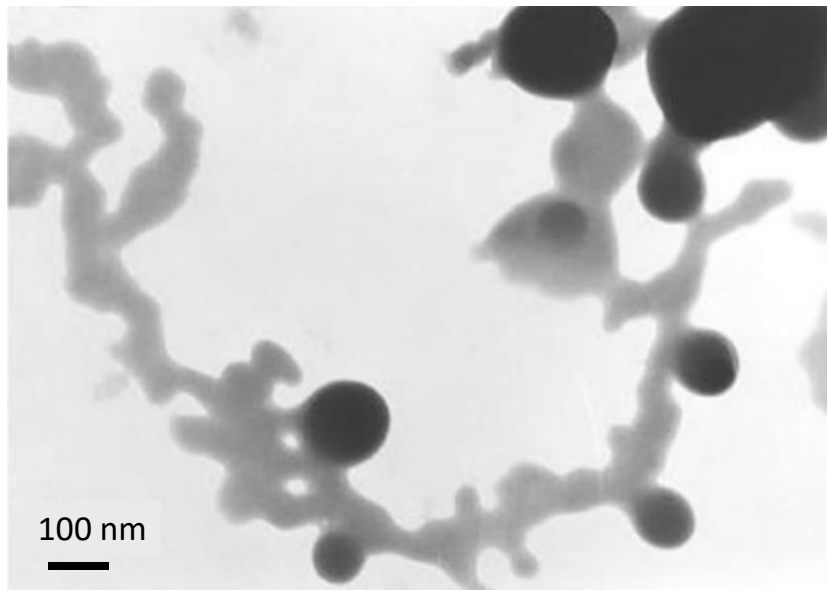
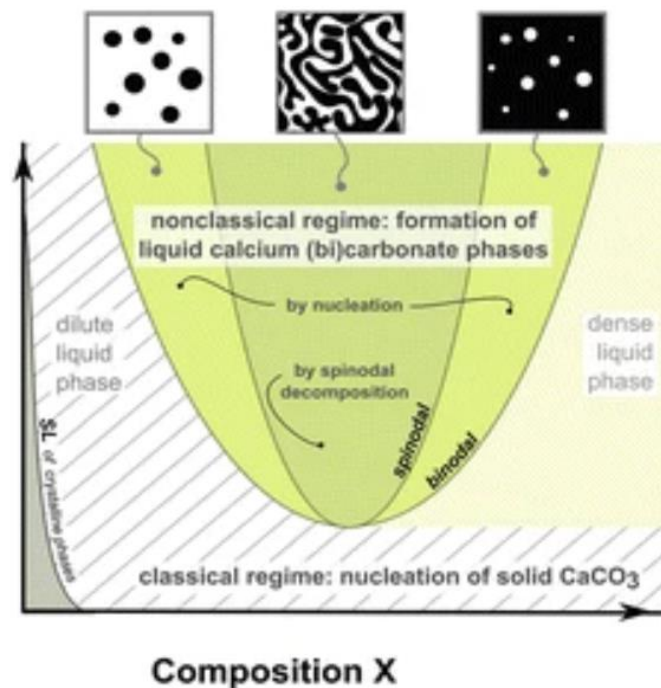
A**B**

Figure 9 : (A) Observation cryo-TEM de la phase PILP en l'absence d'additifs organiques. Echelle = 100 nm. (B) Diagramme de phase hypothétique de CaCO_3 . Figures (A) et (B) respectivement reproduites d'après Rieger *et al.*⁴¹ et Wolf et Gower⁴³.

Par ailleurs, Xu *et al.* proposent que la phase PILP n'est pas liquide mais consiste en un réseau de nanoparticules d'ACC relayés par des chaînes polymères³⁸. Quoiqu'il en soit, la formation d'ACC, qu'elle dérive des PNC ou d'une phase liquide dense a mis la lumière sur le phénomène de polymorphisme. En particulier, des phases amorphes dites proto-vatéritiques, proto-calcitiques et proto-aragonitiques ont été identifiées comme précédant respectivement la formation des polymorphes de la vatérite, de la calcite et de l'aragonite dans le cas où la cristallisation ne passe pas

par un mécanisme de dissolution-reprécipitation^{46,47}. Cela indique qu'il existe une notion d'ordre dans ces phases amorphes. La transition de l'ACC vers une phase cristalline, peu importe laquelle, semble procéder à travers un mécanisme de déshydratation⁴⁸. Néanmoins, il est important de noter que des observations par LP-TEM en temps réel de la précipitation de CaCO₃, dont la formation directe d'ACC, de la vaterite ou de la calcite, montrent que plusieurs mécanismes qu'ils soient classiques ou non-classiques peuvent être présents de manière simultanée⁴⁹.

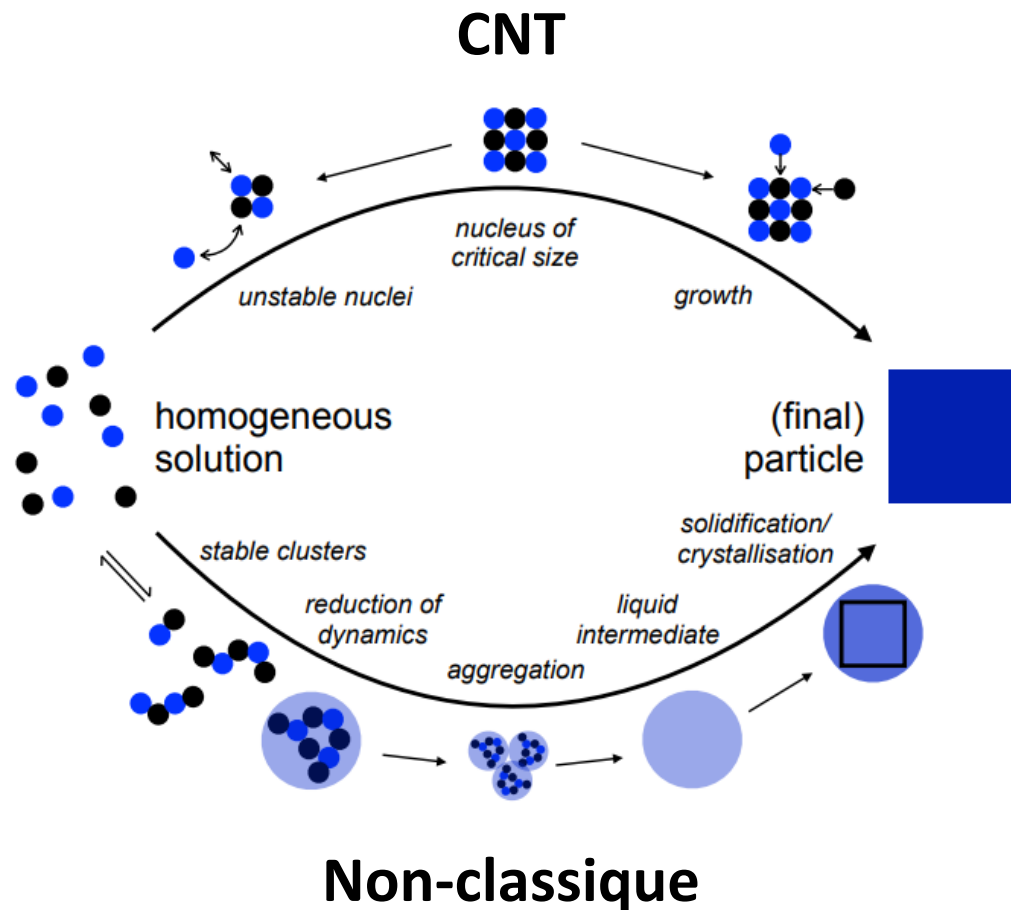


Figure 10 : Comparaison des étapes clés de la CNT (haut) et des mécanismes non-classiques. Image reproduite d'après Gebauer *et al.*⁵⁰.

L'apparition de ces phases transitoires peut être rationalisée dans la Figure 10 résumant les principes d'un mécanisme non-classique, en comparaison à la CNT. Premièrement, les ions sont en équilibre avec des clusters solubles, les PNC. Les PNC s'agrègent et forment alors une phase de liquide dense ou une phase amorphe. Cette phase amorphe évolue ensuite en cristallinité jusqu'à former la phase finale. Ce système est ainsi très versatile ce qui traduit la complexité à étudier les phénomènes de nucléation et de biominéralisation. Il s'agit ainsi d'un très bon exemple discutant des mécanismes dits « non-classiques ».

c) Autres systèmes

Par ailleurs, les carbonates de calcium ne sont pas les seuls minéraux d'importance biologique à cristalliser en suivant un mécanisme non-classique, au moins *in vitro*⁵¹.

Par exemple, l'oxalate de calcium, présent dans les plantes⁵² et dans les calcifications pathologiques des mammifères⁵³, pourrait présenter un mécanisme de cristallisation similaire à celui des carbonates de calcium. Celui-ci impliquerait la formation de PNC stables s'agréant sous forme de DOLLOP. Cette phase soluble nucléerait en une phase amorphe avant de cristalliser⁵⁴. D'autre part, la cristallisation du gypse CaSO_4 , produit par les cnidaires⁵⁵, impliquerait plusieurs espèces transitoires, dont une phase de sulfate de calcium amorphe⁵⁶. Par ailleurs, Stawski *et al.* proposent que la cristallisation de n'importe quel polymorphe de CaSO_4 provient de la nucléation d'une particule primaire de CaSO_4 dont la taille est inférieure à 3 nm. Ces particules primaires auraient tendance à s'organiser entre elles avant de s'agréer puis de cristalliser⁵⁷. Des simulations de dynamiques moléculaires ont par ailleurs proposé que la nucléation de cette phase primaire pourrait être issue de l'agrégation de PNC composés de paires ioniques de CaSO_4 sous la forme de DOLLOP comme proposé pour les carbonates de calcium⁵⁸, bien qu'elles n'aient pas encore été observées. Nous pouvons aussi citer les mécanismes de cristallisation dans les oxydes de fer^{59,60}, les thiosulfates de sodium⁶¹, la silice⁶², les carbonates de métaux divalents⁶³, les acides aminés⁶⁴ ou encore certaines protéines⁶⁵.

Enfin, le cas qui sera développé plus loin sera le mécanisme de nucléation de l'hydroxyapatite, une phase de phosphate de calcium qu'on retrouve chez les vertébrés, dans les os ou les dents par exemple. Dans la suite de ce chapitre, nous décrirons le phénomène de biominéralisation et nous détaillerons en particulier la minéralisation du tissu osseux. Le mécanisme non classique de formation de l'hydroxyapatite sera décrit au travers d'études menées *in vivo* et *in vitro*.

II. Biominéralisation – définition et généralités

La biominéralisation est la capacité des êtres vivants à produire une phase minérale souvent appelée minéral biogénique ou biominéral⁶⁶. Par extension, il s'agit du domaine de science qui vise à étudier la structure et la formation des tissus biologiques minéralisés tels que les os, les dents ou les coquilles. La biominéralisation s'étend à l'ensemble du monde du Vivant comprenant les unicellulaires (bactéries, microalgues) et les pluricellulaires qu'ils soient végétaux ou animaux. On dénombre pas moins de 60 types de biominéraux répartis en 55 catégories d'après Lowenstam et Weiner⁶⁷. La production de ces minéraux par les organismes suit des stratégies propres à l'histoire de l'espèce considérée. Elle peut notamment être provoquée par des phénomènes physico-chimiques, cellulaires et moléculaires permettant aux organismes d'exercer un contrôle exceptionnel sur la phase, la composition, la taille, la morphologie ou encore la répartition spatiale de ces biominéraux dans le but d'apporter des propriétés spécifiques aux tissus biologiques minéralisés. A titre d'exemple, nous présentons les principaux biominéraux abondants dans le Vivant (*Tableau 1*). Il est par ailleurs intéressant de constater que des polymorphes thermodynamiquement instables peuvent être stabilisés par certains organismes.

Minéraux	Formule	Organisme	Fonction
<u>Carbonates de calcium :</u> Calcite Aragonite Vatérite Amorphe	CaCO ₃ CaCO ₃ CaCO ₃ CaCO ₃ .nH ₂ O	Algues Trilobites Poissons Mollusques Ascidies Plantes	Exosquelette Lentilles oculaires Sensation de gravité Exosquelette Spicules Stockage du calcium
<u>Phosphates de calcium :</u> Hydroxyapatite Octacalcium phosphate Amorphe	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ?	Vertébrés Vertébrés Vertébrés	Squelette, dent, stockage du calcium Phase précurseur dans l'os ? Phase précurseur dans l'os ?
<u>Oxalates de calcium :</u> Whewellite Weddellite	CaC ₂ O ₄ .H ₂ O CaC ₂ O ₄ .2H ₂ O	Plantes Plantes	Stockage du calcium Stockage du calcium
<u>Sulfates d'alcalino-terreux :</u> Gypse Baryte Célestite	CaSO ₄ BaSO ₄ SrSO ₄	Larves de méduse Algues Acanthaires	Sensation de gravité Sensation de gravité Support cellulaire
<u>Silice :</u>	SiO ₂ .nH ₂ O	Algues	Exosquelette
<u>Oxydes de fer :</u> Ferrihydrite Goethite Magnétite	5Fe ₂ O ₃ .9H ₂ O α-Fe-OOH Fe ₃ O ₄	Beaucoup d'organismes Chitons et patelles Bactéries Chitons Saumons, abeilles	Stockage du fer Radula Magnétotaxie Radula ?

Tableau 1. Exemple de biominéraux associés à des organismes et des fonctions spécifiques. Tableau reproduit d'après Franke⁶⁸.

De plus, la minéralisation résulte souvent de l'association d'une phase minérale avec une matrice organique (protéines) donnant lieu à des structures composites hiérarchiques complexes⁶⁹. Ainsi, les mécanismes de biominéralisation sont très complexes et représentent, à ce jour, un vaste domaine de recherche. Nous pouvons néanmoins distinguer 2 types de mécanismes de biominéralisation selon la classification proposée par Lowenstam⁶⁶ et généralisée par Mann⁷⁰ :

- Minéralisation biologiquement contrôlée : dans ce cas, la minéralisation se fait autour ou au sein d'une matrice organique. Cette dernière exerce un contrôle sur toutes les étapes de la minéralisation (nucléation, croissance, régulation, cristallisation, etc.) tout au long de la vie de l'organisme. Les cristaux obtenus sont généralement bien ordonnés avec une faible distribution en taille et présentent une orientation bien particulière. Ce type de minéralisation se retrouve dans les organismes multicellulaires et est le plus prépondérant dans les formes de vie élaborées ;
- Minéralisation biologiquement induite : ce mécanisme décrit la formation intracellulaire ou extracellulaire du minéral sans l'élaboration d'une matrice organique. Ce type de minéralisation produit des cristaux présentant des structures similaires, ainsi que des tailles et orientations aléatoires comparables à ceux que l'on peut obtenir lors d'une précipitation en

conditions purement inorganiques. Elle se base sur des principes physico-chimiques et est bien moins rigoureusement contrôlée que la minéralisation biologiquement contrôlée. On la retrouve généralement dans des organismes primitifs tels que certaines bactéries⁷¹ ou algues⁷².

Ainsi, la minéralisation biologiquement contrôlée demeure le mécanisme le plus complexe et s'applique à la plus grande majorité des organismes. Malgré cette diversité, nous pouvons reconnaître des similarités suggérant que les organismes ont suivi une même stratégie d'évolution en adoptant ce mode de minéralisation. En effet, il est courant d'y retrouver les 5 étapes décrites par Siegel *et al.*⁷³ :

- Les cellules créent une matrice de macromolécules organiques ;
- La matrice se structure de manière à définir un espace pouvant être minéralisé (pores, compartiments, gel...);
- Nucléation de la phase solide par l'interaction de protéines spécifiques localisant les ions dans l'espace dédié de la matrice organique ;
- Croissance minérale par flux ionique continu ;
- Contrôle de la morphologie et de la taille par restriction de la taille des zones compartimentées ou par l'introduction de molécules inhibitrices.

Bien sûr, les phases organiques et/ou minérales diffèrent d'un organisme à un autre ou d'une fonction à une autre, ce qui mène à une grande diversité d'ultrastructures (structure à différentes échelles) composites hiérarchiques. Par exemple, les frustules (coques protectrices) des diatomées, algues brunes unicellulaires, sont faites de silice amorphe où des polymères de tétraèdres de silicates SiO_4 se forment sur de longues chaînes polyaminées⁷⁴ et les coquilles de mollusques sont composés de cristaux de carbonates de calcium échafaudés sur des membranes de chitine⁷⁵. Enfin, le tissu osseux est composé d'hydroxyapatite, un phosphate de calcium, s'organisant dans une matrice tridimensionnelle de fibrilles de collagène. Dans le cadre de ce manuscrit, nous développons par la suite le cas détaillé du tissu osseux.

III. Cas du tissu osseux

1) Généralités

Le squelette des vertébrés est composé du tissu osseux et du cartilage. Le tissu osseux assure principalement un rôle mécanique s'illustrant par sa capacité à soutenir le poids du corps et à protéger les organes internes tout en étant relativement flexible. Ses performances mécaniques exceptionnelles proviennent notamment de sa structure composite hiérarchisée à plusieurs niveaux de l'échelle nanométrique à macroscopique. Par ailleurs, le tissu osseux assure aussi un rôle métabolique car il remplit le rôle d'un réservoir ionique permettant d'échanger les ions nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme et d'assurer son osmolarité. Si ses propriétés mécaniques se doivent d'être les plus constantes au cours du temps, le tissu osseux doit aussi être versatile pour assurer ses fonctions métaboliques. Il en résulte que l'os est un matériau complexe se renouvelant en permanence. Ce phénomène de formation/résorption s'appelle le remodelage osseux et traduit l'intelligence de ce matériau hors du commun.

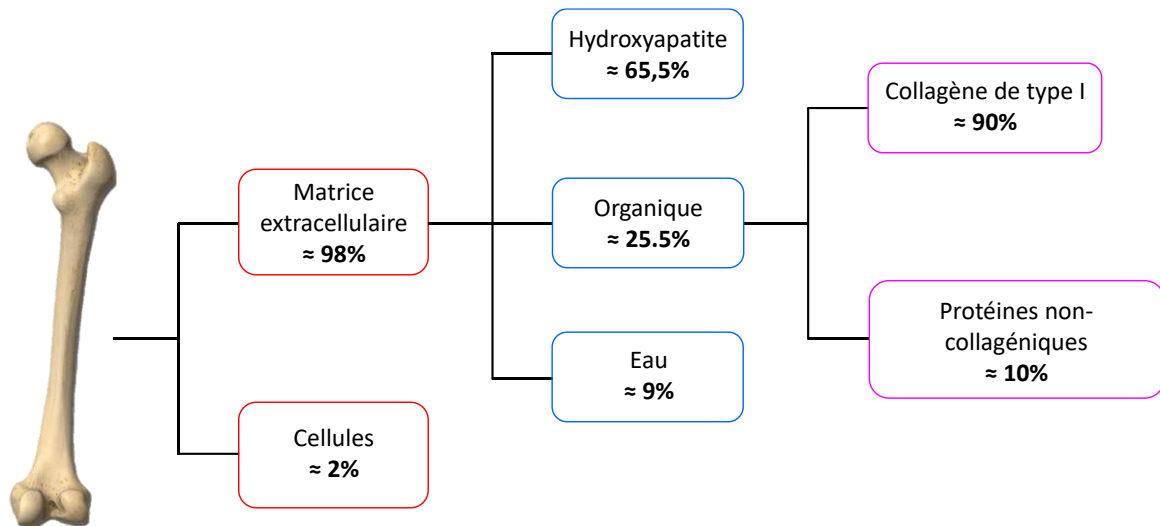


Figure 11 : Composition massique moyenne du tissu osseux dans un os long humain pour un individu adulte. Proportions tirées d'après LeGeros⁷⁶ et Sroga *et al.*⁷⁷.

La composition moyenne du tissu osseux est présentée en Figure 11. On distingue 2 composantes que sont la matrice extracellulaire et les cellules osseuses. Les cellules osseuses, faiblement présentes en masse ($\approx 2\%$), ont un rôle majeur dans le bon fonctionnement de l'organe osseux. On y retrouve les ostéoblastes, responsables de la formation osseuse, les ostéocytes lesquelles sont des ostéoblastes différenciés représentant 95% des cellules osseuses, les ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse, ainsi que les cellules endothéliales assurant les rôles de vascularisation et d'innervation de l'os. Ces cellules agissent de manière concomitante avec les composants individuels de la matrice extracellulaire. Par ordre décroissant en masse, nous trouvons dans cette dernière :

- La phase minérale cristallisant en plaquettes orientées d'hydroxyapatite
- Le collagène de type I représentant 90% de la fraction organique de la matrice extracellulaire et servant de support pour la phase minérale
- De l'eau pouvant interagir avec le collagène, l'hydroxyapatite ou pouvant se situer sous forme d'eau libre dans le fluide extracellulaire
- Les protéines non-collagéniques

Dans les paragraphes suivants nous détaillons ces composantes individuelles plus en détail, puis nous décrivons les modèles tentant de rationaliser la formation osseuse.

2) La phase minérale : l'hydroxyapatite

Le minéral osseux a été identifié en 1926 comme étant de l'hydroxyapatite⁷⁸. L'apatite est le composant majoritaire en masse de l'os. Il s'agit du phosphate de calcium le plus stable thermodynamiquement dans les conditions physiologiques. Chez l'Homme, il est aussi présent dans la dentine et l'émail⁷⁹ ainsi que, éventuellement, sous la forme de calcifications pathologiques dans les reins, notamment dans la plaque de Randall⁸⁰. On la retrouve également dans le règne animal, par exemple dans les défenses de l'éléphant⁸¹, les bois de cerf⁸², la nageoire du poisson zèbre⁸³, ou encore les pattes ravisseuses de certaines squilles multicolores⁸⁴. Enfin, l'apatite est un minéral pouvant être

formé sous de hautes conditions de pressions et de température. Ce minéral a par conséquent un intérêt géologique en étant un très bon marqueur d'éventuelles activités volcaniques et hydrothermales, de par sa composition^{85,86}.

Le nom de cette phase provient de la structure dans laquelle elle cristallise : la structure apatitique $M_{10}(XO_4)_6(Y)_2$, où M est un cation divalent, X est un anion trivalent et Y est un anion monovalent. L'hydroxyapatite désigne ainsi le phosphate de calcium $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, son suffixe provenant de la nature des anions monovalents, les ions hydroxyles OH^- .

L'hydroxyapatite osseuse cristallise dans une maille hexagonale selon le groupe d'espace $P6_3/m$). Les paramètres cristallographiques de la maille sont $a = b \approx 9,4 \text{ \AA}$, $c \approx 6,9 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ et $\gamma = 120^\circ$ ⁸⁷. Les 10 atomes de calcium occupent 2 sites cristallographiques différents, les 24 atomes d'oxygène contenus dans les phosphates occupent 3 sites cristallographiques, les 6 atomes de phosphore occupent 1 site cristallographique et les 2 ions hydroxyles occupent 1 site cristallographique (Figure 12A). Ainsi, la résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide et la diffraction des rayons X (DRX) sont des méthodes de choix quant à l'identification de cette structure. Par exemple, les ions hydroxyles peuvent être identifiés par un signal relativement fin à 0 ppm par RMN 1H (Figure 12B), les ions PO_4^{3-} par une unique résonance à 2,8 ppm par RMN ^{31}P (Figure 12C) et les 2 sites correspondants aux ions calcium peuvent être identifiés, plus difficilement du fait de la faible sensibilité intrinsèque du noyau ^{43}Ca , par RMN ^{43}Ca (Figure 12D). Ces résultats seront largement exploités dans le cadre de ce travail de thèse.

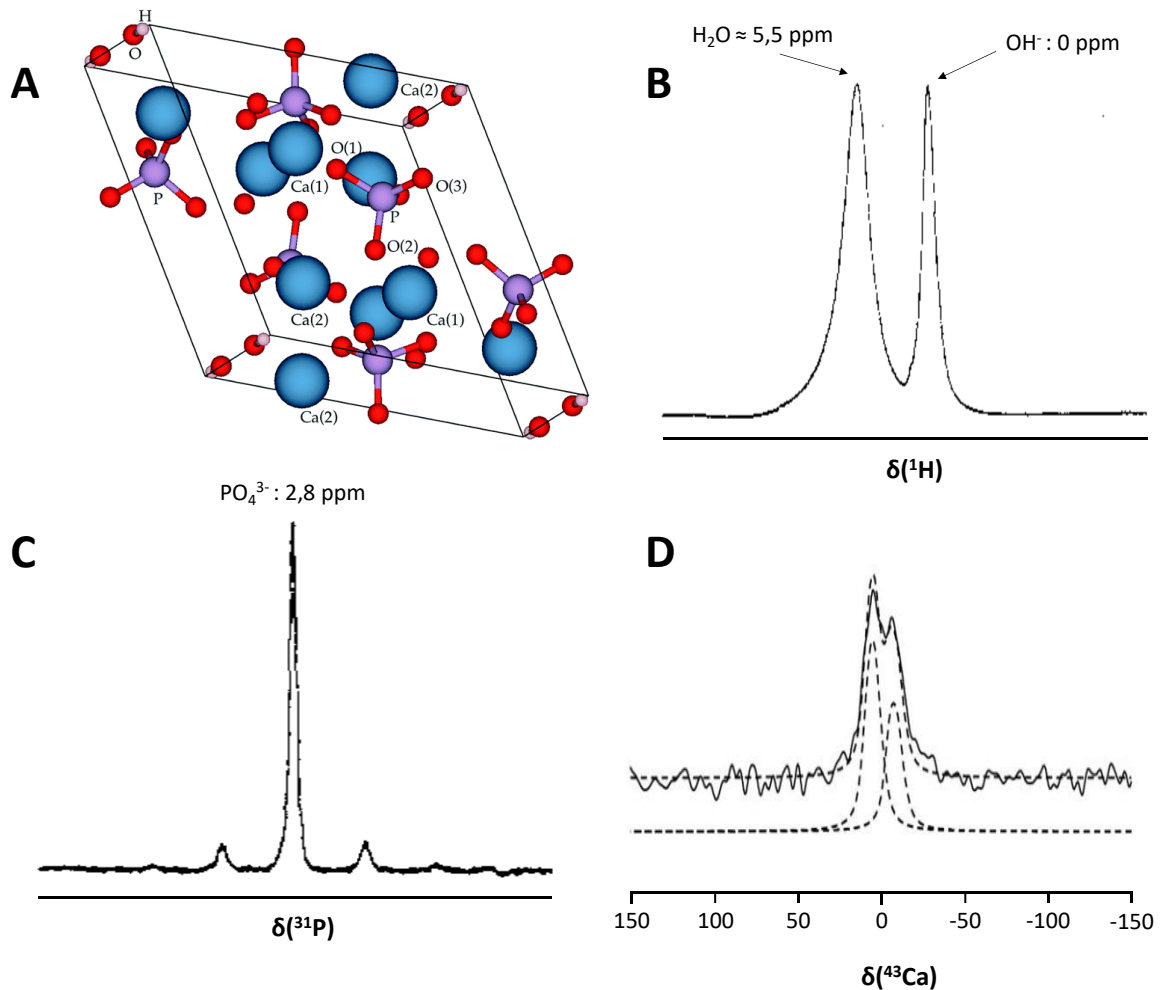


Figure 12: (A) Structure de l'hydroxyapatite dans sa maille. Signature spectrale de l'hydroxyapatite par RMN du solide (B) du noyau ^1H , (C) du noyau ^{31}P et (D) du noyau ^{43}Ca . Les figures A, B, C et D sont respectivement issus des études de Zilm *et al.*⁸⁸ Yesinowski et Eckert⁸⁹, Rothwell *et al.*⁹⁰ et Laurencin *et al.*⁹¹.

Les ions phosphates PO_4^{3-} forment selon l'axe c des hexagones réguliers qui, d'une maille à l'autre, s'empilent de manière régulière sous forme de strates. Cet empilement constitue la structure apatitique et engendre la création de deux tunnels colinéaires à l'axe cristallographique c du réseau, comme montré en Figure 13. En particulier, le tunnel I est occupé par 4 atomes de calcium et le tunnel II est occupé par les 6 autres atomes de calcium et les ions hydroxyles. Le tunnel II est plus large que le tunnel I, pouvant laisser passer divers atomes susceptibles de se substituer aux atomes déjà présents dans la maille. Ces substitutions ioniques induisent des modifications structurales pouvant mener à du désordre local. Comme nous pouvons le constater dans le *Tableau 2*, nous pouvons retrouver une multitude d'ions inorganiques dans les apatites biologiques. L'hydroxyapatite étant un composé ionique, une substitution ionique par un ion de charge différente peut s'accompagner d'autres substitutions ou de la création de lacunes de manière à assurer l'électroneutralité⁹².

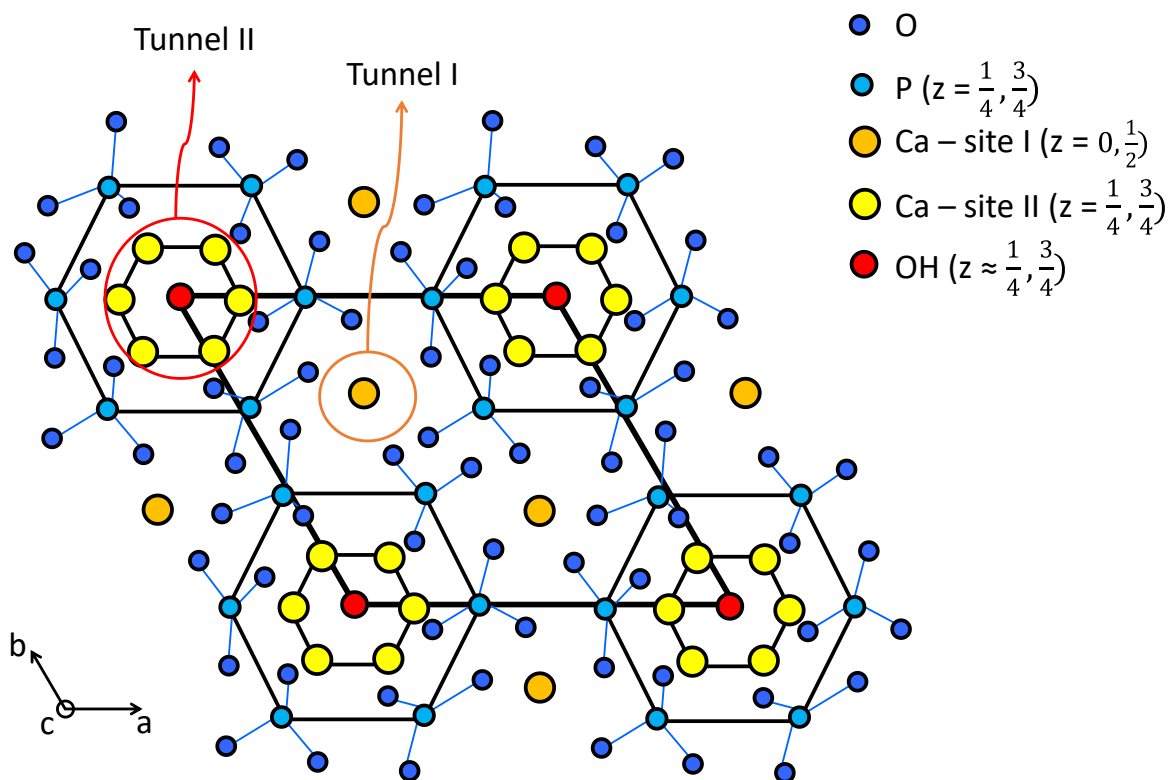


Figure 13 : Représentation de la structure cristalline de l'hydroxyapatite projetée selon l'axe c. Les tunnels I et II sont représentés par des cercles orange et rouge, respectivement. Image reproduite selon Beuvelot⁹³.

Ions inorganiques	Os	Email	Dentine	Hydroxyapatite stoechiométrique
Ca ²⁺ (%)	36,6	37,6	40,3	39
HPO ₄ ²⁻ / PO ₄ ³⁻ (%)	17,1	18,3	18,6	18,5
HCO ₃ ⁻ / CO ₃ ²⁻ (%)	4,8	3	4,8	
Na ⁺ (%)	1	0,7	0,1	
K ⁺ (%)	0,07	0,05	0,07	
Mg ²⁺ (%)	0,6	0,2	1,1	
Sr ²⁺ (%)	0,05	0,03	0,04	
Cl ⁻ (%)	0,1	0,4	0,27	
F ⁻ (%)	0,1	0,01	0,07	

Tableau 2. Compositions ioniques massiques dans diverses apatites biologiques. Proportions tirées de Elliott⁹⁴.

Dans le cas du minéral osseux, la substitution ionique la plus remarquable concerne la substitution des ions PO₄³⁻ par des ions CO₃²⁻, on parle alors de substitutions de type B. Ce type de

substitution s'accompagne généralement d'une lacune au niveau des ions Ca^{2+} , ainsi que d'une lacune au niveau des ions OH^- ou d'un apport d'ion Na^+ dans la structure de manière à assurer l'électroneutralité⁹⁵. Par ailleurs, les ions carbonates peuvent aussi se substituer aux ions hydroxyles, on parle alors de substitution de type A. Ce type de substitution peut aisément être obtenu dans des hydroxyapatites synthétisées à haute température⁹⁶, mais reste minoritaire dans les apatites biologiques. Ainsi, le minéral osseux ne correspond pas à de l'hydroxyapatite stœchiométrique *stricto sensu*, mais est plutôt défini comme une hydroxyapatite carbonatée et déficiente en calcium et hydroxyles. Au-delà des substitutions par des ions carbonates, le minéral osseux peut faire l'objet de substitutions ioniques très variées, pouvant typiquement accueillir tous les ions contenus dans le plasma sanguin dans la totalité de ses sites cristallographiques sans pour autant modifier sa structure de manière significative⁹⁴ :

- Les sites cristallographiques des ions Ca^{2+} peuvent accueillir des ions Na^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , K^+ , etc. ;
- Les sites des ions PO_4^{3-} peuvent accueillir des ions CO_3^{2-} ou HPO_4^{2-} ;
- Les sites des ions OH^- peuvent accueillir des ions Cl^- , F^- , CO_3^{2-} .

La versatilité de ces substitutions entraîne des propriétés et réactivités différentes pour les apatites biologiques. Elles permettent notamment d'expliquer le rôle de réservoir ionique du tissu osseux, pouvant capter et relarguer des ions de manière contrôlée. L'environnement moyen d'un tel matériau s'en retrouve plus désordonné qu'une hydroxyapatite stœchiométrique comme on peut l'observer par exemple par un élargissement des signaux en DRX (Figure 14) ; l'élargissement étant aussi dû à un effet de taille des cristallites.

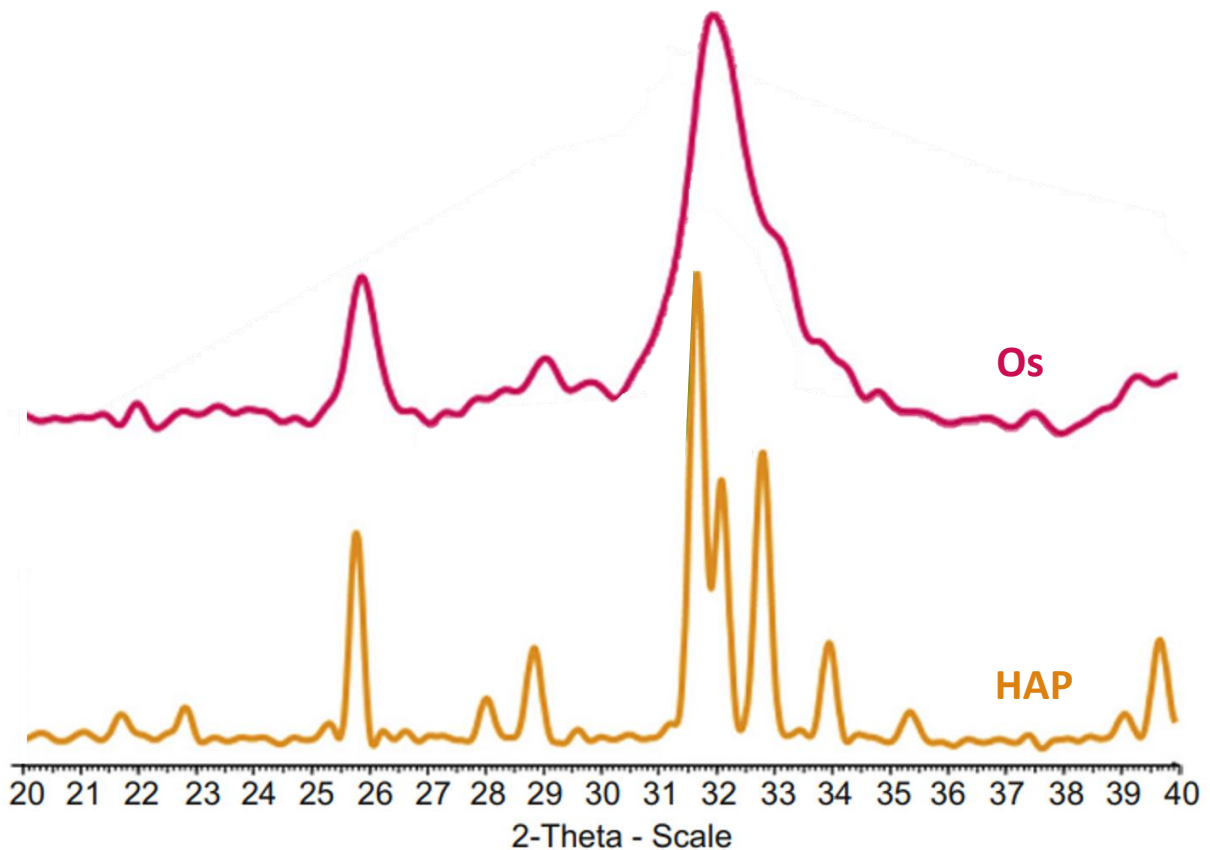


Figure 14 : Comparaison des signatures typiques d'une hydroxyapatite stœchiométrique (bas, jaune) et d'un os bovin (haut, magenta) par DRX. Image reproduite d'après Boskey⁹⁷.

Par ailleurs, les substitutions par les ions carbonates peuvent participer à la formation d'un domaine surfacique dont découlent des propriétés importantes du minéral osseux⁹⁸. En effet, il est proposé que les apatites biologiques sont composées de 2 domaines distincts^{99,100} :

- Un cœur cristallin d'apatite majoritairement composé d'ions Ca^{2+} , PO_4^{3-} et OH^- ;
- Une couche de surface désordonnée riche en ions HPO_4^{2-} et en molécules d'eau¹⁰¹.

Cette dernière est aussi appelée couche désordonnée¹⁰², couche amorphe¹⁰³, couche hydratée¹⁰⁰ ou encore domaine non-apatitique dans la littérature. Cette dernière appellation indique que cette couche amorphe est bien structurellement différente de l'hydroxyapatite, d'après des études par RMN du solide¹⁰² et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)¹⁰⁰. Cette couche de surface posséderait un environnement facilement accessible permettant de propager de nombreuses substitutions ioniques, permettant par exemple de substituer des ions HPO_4^{2-} par des ions CO_3^{2-} , ou des ions Ca^{2+} par des ions Mg^{2+} ou Sr^{2+} ¹⁰⁴. Par ailleurs, ces nombreuses substitutions ioniques sont suspectées d'être responsables de la régularisation de l'osmorité et du pH du fluide extracellulaire par le tissu osseux.

L'implication de ce matériau particulier dans les fonctions métaboliques peut aussi être rationalisé par sa solubilité. En effet, Legros *et al.* ont proposé des formules brutes pour le minéral osseux et l'émail¹⁰⁵ :

- Minéral osseux : $\text{Ca}_{8,3}\square_{1,7}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{HPO}_4/\text{CO}_3)_{1,7}(\text{OH}/\frac{1}{2}\text{CO}_3)_{0,3}\square_{1,7}$

- Email : $\text{Ca}_{9,4}\square_{0,6}(\text{PO}_4)_{5,4}(\text{HPO}_4/\text{CO}_3)_{0,6}(\text{OH}/\frac{1}{2}\text{CO}_3)_{1,4}\square_{0,6}$

L'émail ne fait l'objet que de très peu de substitutions ioniques et s'en retrouve bien moins soluble, de manière comparable à une hydroxyapatite stœchiométrique. Logiquement, l'émail n'est pas résorbé¹⁰⁶ ce qui s'avère nécessaire pour résister à l'acidité des aliments ou des bactéries de la flore buccale. Au contraire, il est proposé que les substitutions ioniques et les lacunes de l'apatite osseuse facilitent sa dissolution pouvant expliquer son caractère résorbable et son rôle de réservoir ionique¹⁰⁷.

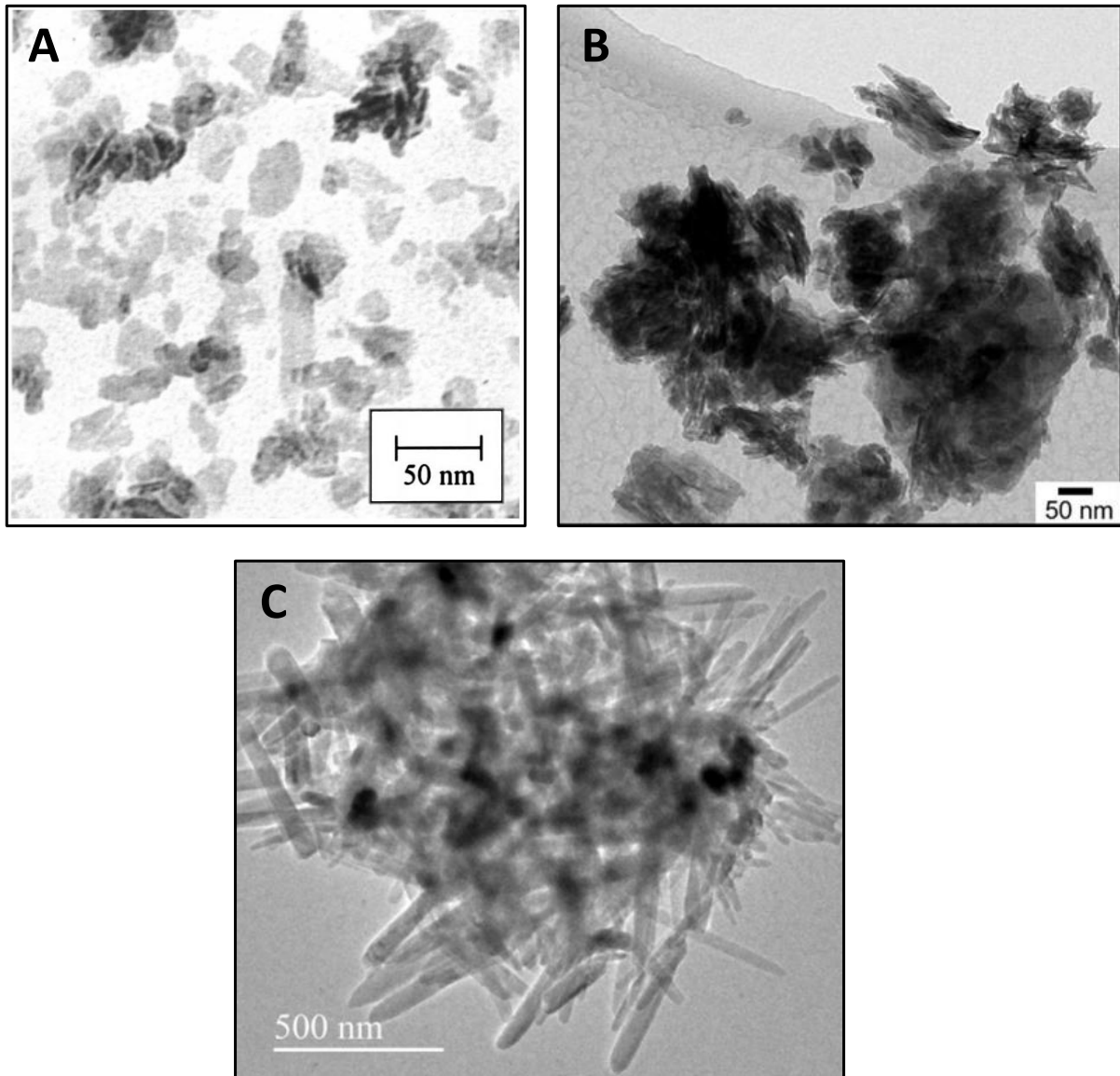


Figure 15 : Clichés de microscopie électronique en transmission (A) d'un os bovin après avoir retiré sa fraction organique, (B) d'une hydroxyapatite carbonatée et (C) d'une hydroxyapatite stœchiométrique. Les images A, B et C sont respectivement reproduites d'après Kuhn¹⁰⁸, Von Euw *et al.*¹⁰⁹ et Kalaiselvi *et al.*¹¹⁰.

Par ailleurs, cette solubilité est exacerbée par les dimensions des cristaux d'apatite osseuse et leur grande surface spécifique. En effet, ce biominéral cristallise sous la forme de plaquettes nanométriques irrégulières d'environ 15 nm de largeur, 30 nm de longueur et 2 à 4 nm d'épaisseur

(Figure 15A). De manière surprenante, ces plaquettes sont relativement petites en comparaison à leurs analogues synthétiques, qui présentent des longueurs supérieures à 100 nm (Figure 15B). Comme nous le verrons par la suite, ces différences de taille peuvent s'expliquer par la présence de molécules organiques, et plus particulièrement par le rôle structural du collagène de type I. Par ailleurs, la morphologie des apatites osseuses et carbonatées diffère de l'apatite stœchiométrique qui cristallise sous la forme de bâtonnets (Figure 15C). En effet, la maille hexagonale de l'apatite, où $a = b$, suggère que la croissance du cristal se fait selon l'axe c . Il est donc étrange de constater que l'apatite osseuse cristallise sous forme de plaquettes.

Ainsi, nous concluons de cette partie que l'apatite osseuse diffère grandement de l'hydroxyapatite stœchiométrique. La composition, la morphologie et la taille des cristaux représentent autant de différences qui expliquent les propriétés si particulières de l'os. En particulier, l'apatite biologique fait l'objet de nombreuses substitutions ioniques facilitées par une couche de surface amorphe, permettant d'expliquer les propriétés de remodelage osseux et de réservoir ionique. Il convient de préciser que la couche de surface amorphe et les substitutions ioniques moyennent le rapport Ca/P de l'apatite biologique à une valeur moyenne de 1,5 contre 1,67 pour une hydroxyapatite stœchiométrique. On peut alors définir l'apatite biologique comme une hydroxyapatite carbonatée, déficiente en ions Ca^{2+} et OH^- et possédant une couche de surface amorphe. Celle-ci a été estimée à 0,8 nm d'épaisseur dont la représentation est présentée en Figure 16. Ce sont notamment ces caractéristiques qui permettent de définir le terme « d'hydroxyapatite biomimétique », représentant des hydroxyapatites carbonatées présentant une couche de surface amorphe synthétiques. Elles sont largement étudiées dans la littérature dans l'objectif de comprendre la biominéralisation osseuse et les éventuelles applications d'ordre biomédical qui en découlent. Nous tenons cependant à nuancer la nature amorphe de cette couche de surface, car elle est observée dans des échantillons qui sont très souvent séchés. Or, l'étude de cette couche de surface amorphe en conditions humides *in vitro*, qu'elle ait été séchée préalablement ou non, semble montrer une organisation au niveau moléculaire semblable à une phase proche du phosphate octocalcique (OCP : $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)¹¹¹. Par abus de langage, **le terme « d'hydroxyapatite biomimétique » sera employé tout au long de cette thèse pour décrire des hydroxyapatites sèches présentant une couche de surface amorphe, sans quantifier nécessairement la présence d'ions carbonates**. Nous justifions cette appellation par l'usage de conditions de précipitation, tout au long de cette thèse, proches des conditions physiologiques, telles que :

- Le pH était proche du pH physiologique de 7,4.
- Les concentrations en ions phosphates et calcium étaient de l'ordre du mM.
- La force ionique était semblable à celle du plasma sanguin.
- Les précipitations étaient réalisées à température ambiante (T_{amb}).
- Nous n'avons pas ajouté d'ions carbonates, mais les réactions étaient suffisamment longues pour que du CO_2 provenant de l'air ambiant puisse se dissoudre dans nos solutions.

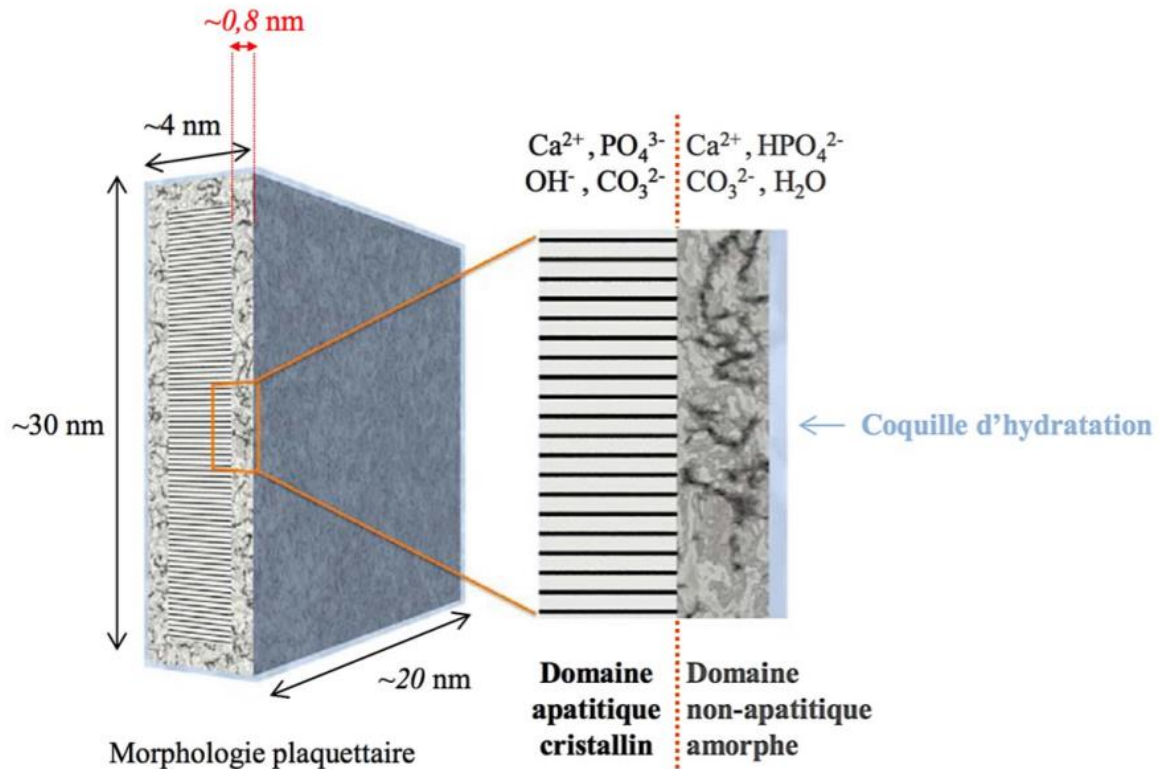


Figure 16 : Représentation schématique du minéral osseux composé d'un cœur cristallin et d'une couche de surface amorphe. Image reproduite d'après Wang *et al.*¹¹² et Robin¹¹³.

Ceci étant dit, la description des propriétés exceptionnelles du tissu osseux ne s'expliquent pas uniquement par la phase minérale, mais plus particulièrement par l'ultrastructure formée par la minéralisation intrafibrillaire de collagène. Dans la prochaine partie, nous présentons la molécule de collagène plus en détail et discutons de son implication dans le tissu osseux.

3) Le collagène

Le collagène n'est pas seulement la protéine la plus abondante de la matrice extracellulaire, car elle est aussi la protéine la plus abondante dans le règne animal, représentant entre 25 et 30% du protéome (totalité des protéines d'un organisme) humain. Le collagène n'est pas une protéine unique, car il existe une vingtaine de types de collagène possédant une structure propre spécifique à des organes et fonctions particulières¹¹⁴. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur le collagène de type I, que l'on trouve principalement dans la structure de l'os, de la peau, des tendons et de la cornée^{115,116}. En particulier, le collagène de type I représente 20 à 25% en masse du tissu osseux et 90% de sa fraction organique.

Une molécule de collagène, tous types confondus, se définit comme une triple hélice droite de chaînes polypeptidiques, appelées chaînes α en hélice gauche (Figure 17A). Chaque chaîne polypeptidique se compose d'un millier d'acides aminés¹¹⁷ suivant les motifs séquentiels de répétition Gly-X-Y où X et Y sont fréquemment de la proline et de l'hydroxyproline¹¹⁸. On y trouve également les acides aminés alanine et hydroxylysine (Figure 17B). La triple hélice a une longueur de 300 nm, un

diamètre d'environ 1,5 nm et un pas (rotation de 360°) de 8,6 nm, soit environ 30 acides aminés. Sa masse molaire est d'environ 285—300 kDa¹¹⁷.

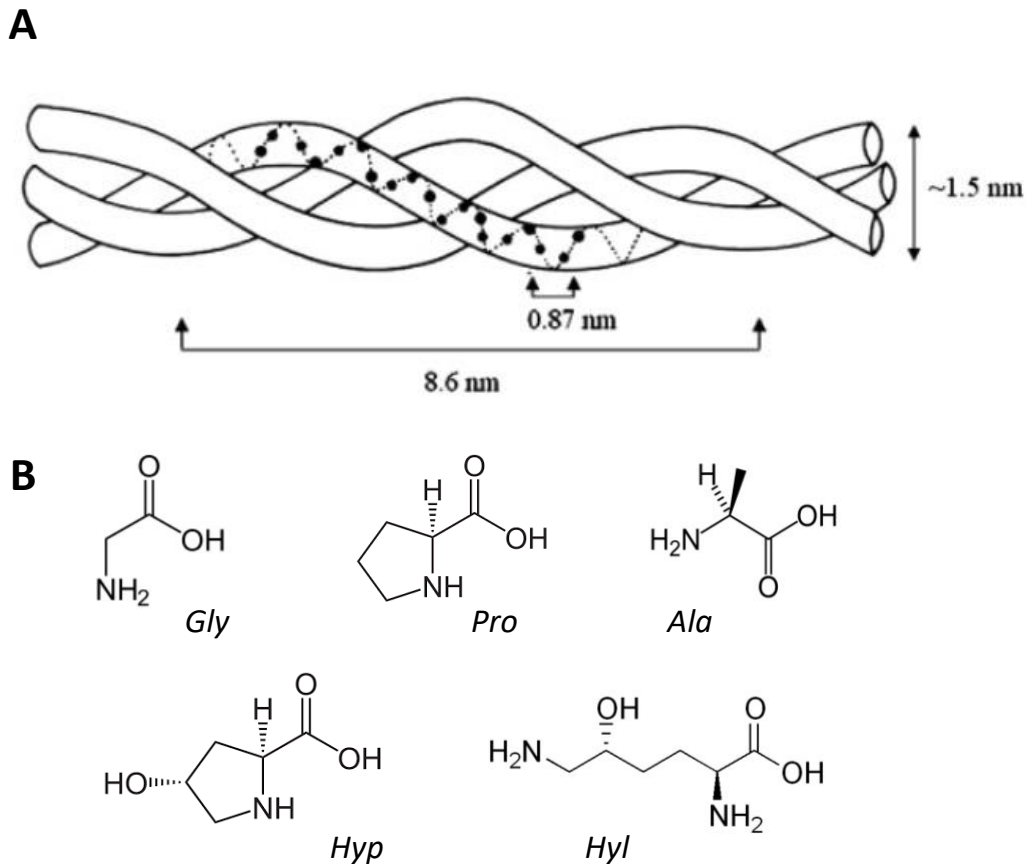


Figure 17 : (A) Représentation schématique de la triple hélice de collagène. (B) Acides aminés les plus fréquents dans la séquence de collagène, où Gly, Pro, Ala, Hyp et Hyl sont respectivement la glycine, la proline, l'alanine, l'hydroxyproline et l'hydroxylysine.

In vivo, les chaînes polypeptidiques α sont formées au sein des cellules et s'assemblent en procollagène, un précurseur du collagène possédant des propeptides chargés négativement à chacune de ses extrémités. Ces dernières confèrent au procollagène une solubilité plus élevée que celle du collagène. Ces propeptides terminaux sont ensuite clivés par l'action enzymatique des procollagènes peptidases pour former la molécule de collagène, insoluble à pH physiologique. Une autre enzyme, la lxyloxydase va alors favoriser l'auto-assemblage des molécules de collagène sous la forme de fibrilles. Ce phénomène s'appelle la fibrillogénèse.

Ces fibrilles présentent un diamètre variable de 50 à 300 nm lié aux conditions de formation spécifique selon la fonction du tissu^{119,120}. Les molécules de collagène interagissent entre elles par le biais de liaisons hydrogènes et de forces électrostatiques. Ces dernières entraînent un décalage périodique de 234 acides aminés, soit 67 nm, entre chaque chaîne. Cela se traduit par la formation d'espaces de 40 nm et de zones de recouvrement de 27 nm dans les fibrilles de collagène, aussi appelées « gaps » et « overlaps » dans la littérature, respectivement. Les observations de ces zones de gaps et d'overlaps en présence d'un contrastant s'accumulant dans ces zones par microscopie électronique en transmission sont repérées par des alternances de zones claires et sombres donnant une apparence striée aux fibrilles de collagène (Figure 18)¹²¹.

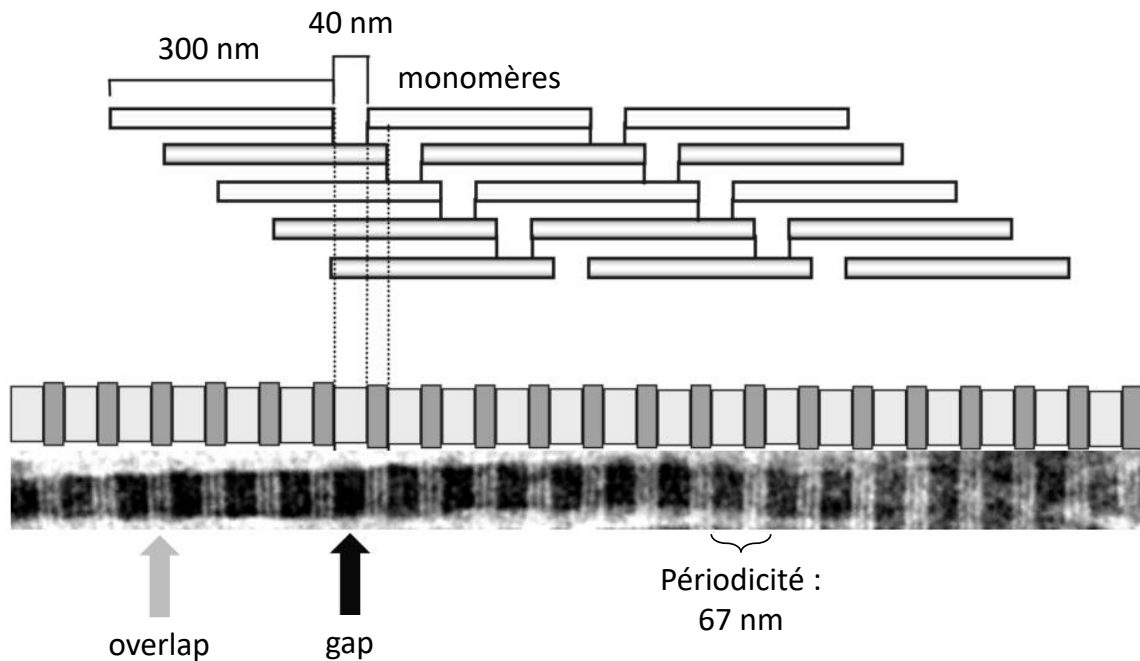


Figure 18 : Représentation schématique de l'organisation des molécules de collagènes assemblées en fibrilles. Le schéma et l'observation TEM ont respectivement été reproduits d'après Gelse *et al.*¹²² et Robin¹¹³.

La périodicité de ces zones de gap et d'overlap s'avère très importante dans la minéralisation osseuse, car il s'agit des zones préférentielles de nucléation et de croissance des cristaux d'apatites biologiques¹²³. Ainsi, ce serait la taille de ces zones qui limiterait la croissance des cristaux d'apatite et expliquerait la taille réduite des apatites osseuses. Par ailleurs, des expériences de DRX et de diffraction électronique suggèrent que les cristaux sont coalignés selon leur axe cristallographique *c* le long de l'axe longitudinal des fibrilles de collagène¹²⁴. Cet agencement tridimensionnel des plaquettes d'apatite biologique dans les fibrilles de collagène permettrait d'expliquer les propriétés mécaniques du tissu osseux telles que sa forte résistance aux fractures et sa plasticité^{125,126}. La dualité de cette phase composite peut être rationalisée, comme énoncé précédemment, par un modèle en 12 niveaux d'architecture allant de l'échelle nanométrique à l'échelle macroscopique de l'os (Figure 19). Dans ce modèle, les plaquettes d'hydroxyapatite sont composées de cristaux aciculaires.

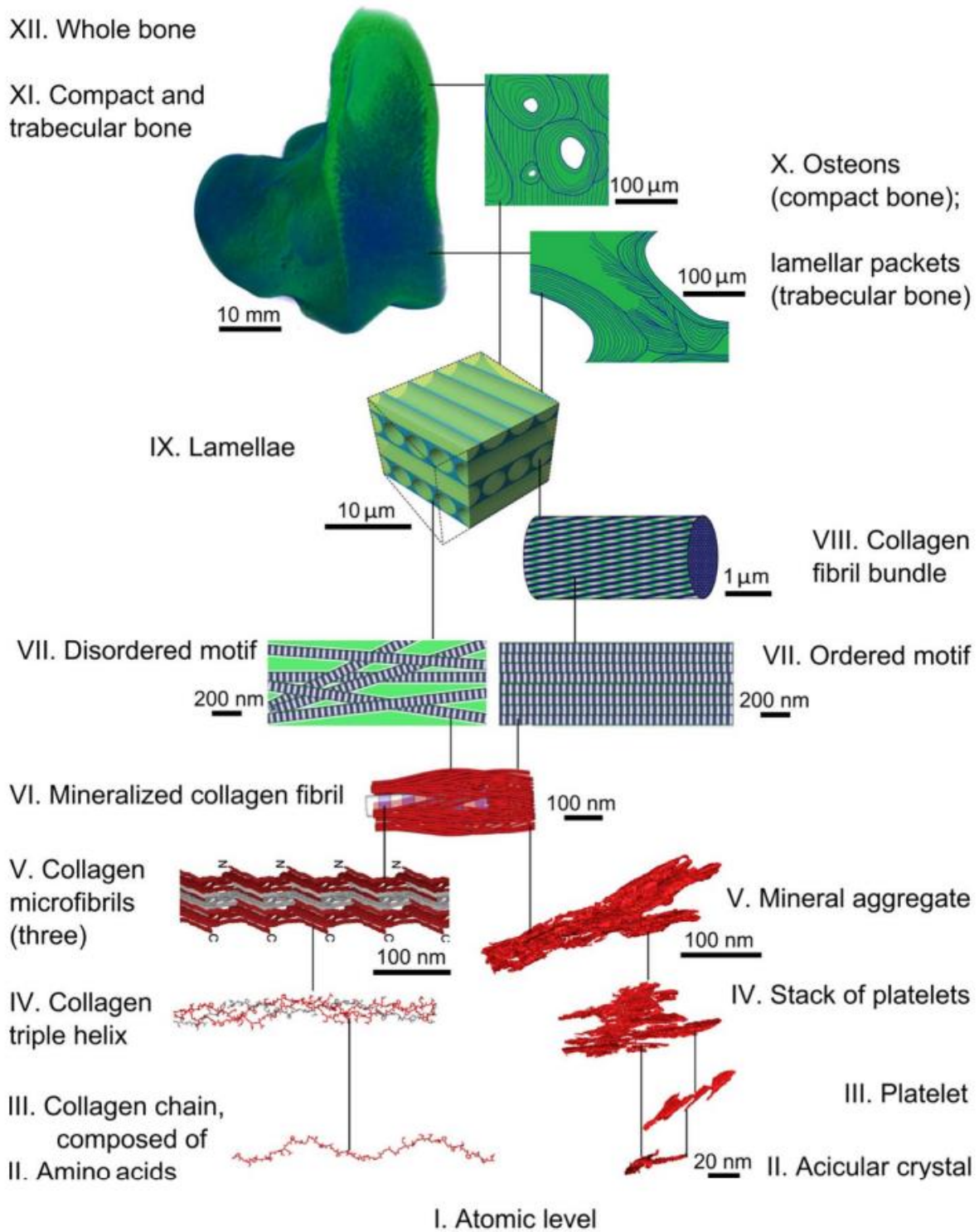


Figure 19 : Organisation hiérarchique du tissu osseux en 12 niveaux. Reproduction d'après Reznikov *et al.*¹²⁷.

Dans la pratique, la minéralisation *in vitro* de collagène de type I ne permet pas d'induire la minéralisation intrafibrillaire par de l'apatite biomimétique, sauf si cette dernière est opérée par un assemblage coordonné des fibrilles de collagène et de la phase minérale induit par co-concentration et remontée de pH¹²⁸. Si les fibrilles de collagène sont déjà formées, la minéralisation se produit de manière aléatoire dans la solution et en surface des fibrilles de collagène (Figure 20A). En revanche,

l'ajout d'additifs organiques, telles que des chaînes polymères chargées négativement, typiquement l'acide polyaspartique, permet d'induire cette minéralisation intrafibrillaire (Figure 20B). Il a alors été proposé que le processus de minéralisation était contrôlé par les protéines non-collagéniques bien que présentes dans de faibles proportions dans la matrice extracellulaire, certaines d'entre elles présentant une structure analogue à ces polyélectrolytes de synthèse¹²⁹⁻¹³¹. Dans les paragraphes suivants, nous décrivons les protéines non-collagéniques plus en profondeur et discutons de leur potentielle implication dans la minéralisation osseuse.

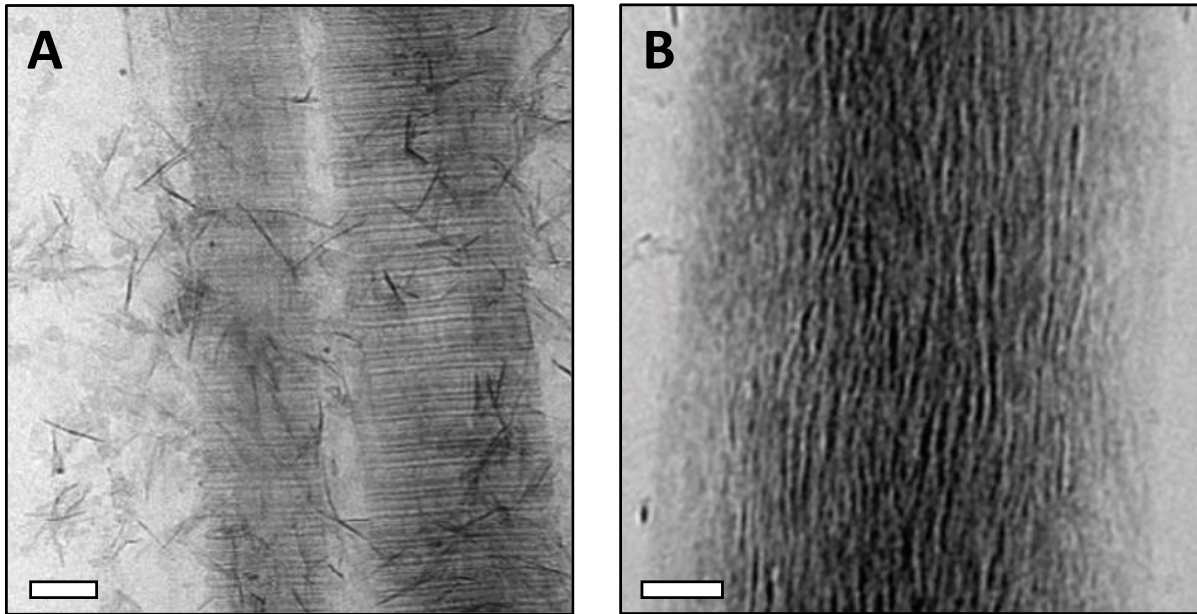


Figure 20 : Observations cryo-TEM de la minéralisation d'hydroxyapatite en présence de collagène (A) sans acide polyaspartique et (B) avec de l'acide polyaspartique. Echelle = 50 nm. Image reproduite d'après Nudelman *et al.*¹²⁹.

4) Les protéines non-collagéniques

Les protéines non-collagéniques ou NCP sont des macromolécules présentes dans la matrice extracellulaire de l'os et représentent environ 2—3% de la fraction organique de cette dernière. La majorité de ces NCP sont formées par les ostéoblastes au sein même de la matrice extracellulaire. Le reste des NCP, environ 25% d'entre elles, ont une origine exogène car elles proviennent du plasma sanguin. Par exemple, l'albumine et la transferrine sont des protéines plasmatiques¹³². On dénombre pas moins de 200 protéines dans la famille des NCP endogènes¹³³. Il est ainsi difficile d'en dresser une liste exhaustive. Néanmoins, elles peuvent être classées en 3 familles (Figure 21) :

- Les protéoglycanes sont des protéines contenant une chaîne polypeptidique à laquelle s'ajoute des chaînes linéaires glycosaminoglycanes (ou GAGs). Cette famille de protéines peut être subdivisée en 2 sous-familles selon leur taille : les protéoglycanes larges et les petits protéoglycanes riches en résidu leucine. Globalement, les protéoglycanes sont connues pour prévenir et inhiber la calcification du cartilage et des os, ainsi que pour moduler la fibrillogénèse et l'agencement du minéral au sein de la matrice de collagène¹³⁴;

- Les protéines GLA riches en résidus glutamate gamma-carboxylé. Cette famille comprend l'ostéocalcine, la protéine la plus abondante dans la matrice extracellulaire osseuse, et la Matrix-GLA Protein ou MGP. L'ostéocalcine contient des résidus acides permettant notamment de séquestrer des ions calcium pour initier la nucléation et promouvoir la croissance minérale^{135,136}. Par ailleurs, elle permettrait de réguler les populations d'ostéoclastes et d'ostéoblastes ayant ainsi une implication dans la résorption osseuse¹³⁷. La MGP, quant à elle, est suspectée d'avoir un rôle inhibiteur sur la minéralisation osseuse¹³⁸.
- Les glycoprotéines sont des protéines composées d'une chaîne polypeptidique sur laquelle viennent se greffer des chaînons formés de plusieurs oses ou dérivés d'oses. Cette famille comprend, entre autres, l'alkaline phosphatase, l'ostéonectine, la tétranectine et les protéines RGD contenant un site de fixation riche en résidus arginine, glycine et aspartate. Cette sous-famille comprend les protéines thrombospondine, fibronectine et vitronectine, ainsi qu'une autre classification de protéines : les SIBLINGs (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins). Les glycoprotéines sont notamment connues pour moduler la minéralisation osseuse en assistant les cellules (régulation des populations, aide à la différenciation cellulaire...) et en se fixant sur des domaines spécifiques (collagènes, cellules).

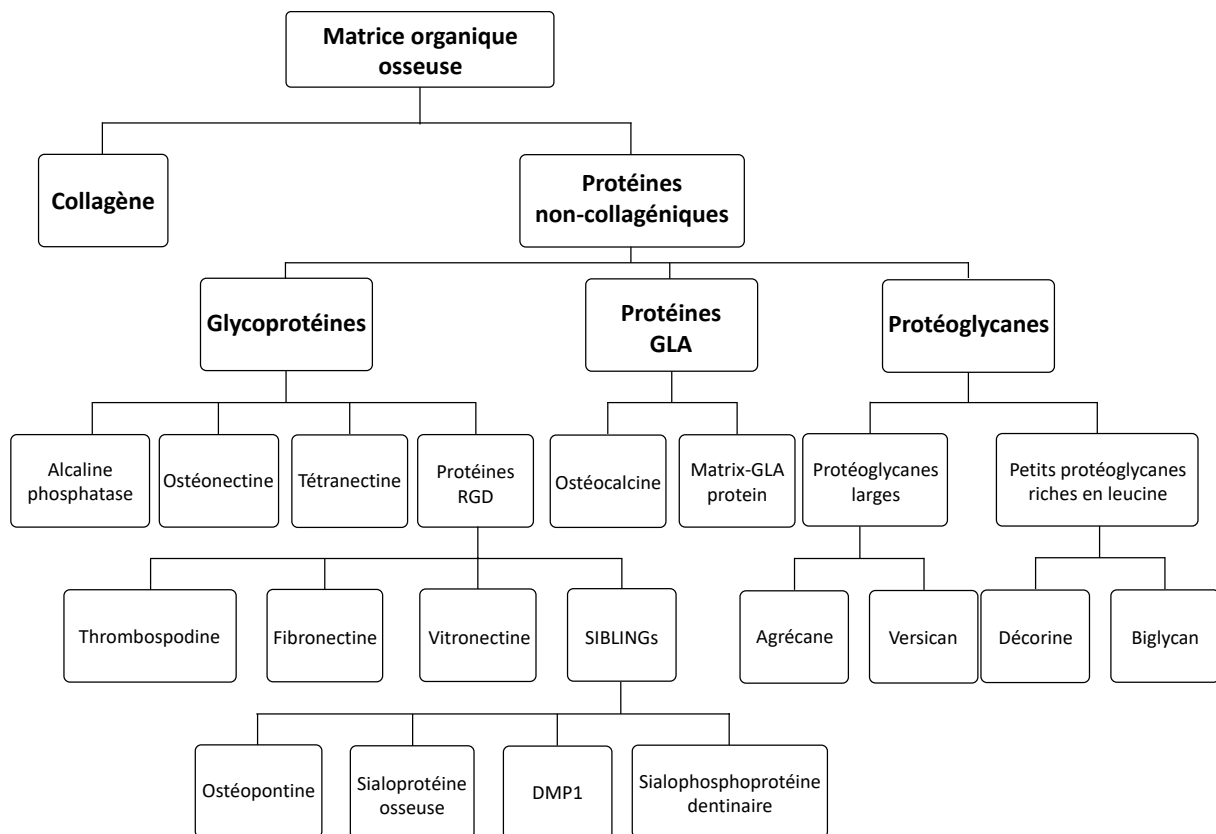


Figure 21 : Classification des protéines présentes dans la matrice organique osseuse. Reproduction d'après Carvalho *et al.*¹³⁹.

Ainsi, les NCP ont toutes un rôle précis à jouer dans la vie de l'organe osseux. Certaines d'entre elles promeuvent la minéralisation, d'autres la freinent, créant une balance nécessaire et versatile quant au phénomène de remodelage osseux. Pour cela, certaines protéines interagissent avec les cellules, d'autres avec les ions inorganiques et/ou d'autres protéines structurales, tel que le collagène. Dans le cadre de ce manuscrit, nous nous intéressons particulièrement aux protéines acides, les

SIBLINGs qui sont fortement suspectées de contrôler la nucléation, la croissance et la cristallinité de la phase minérale. Cette dernière famille répond aussi à l'appellation de « protéines acides » du fait des structures riches en résidus acides aspartate et glutamate (30 à 36% du nombre total de résidus) des protéines qui la composent. Elle comprend les protéines de l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse, la Dentin Matrix Protein 1 (ou DMP1) et la sialophosphoprotéine dentinaire. Elles possèdent toutes un grand nombre de résidus acide et phosphosérine ayant une forte affinité avec les ions calcium. Par ailleurs, elles ont aussi la faculté de se fixer, les unes sur le collagène, les autres sur le minéral naissant de manière à promouvoir ou inhiber la croissance de ce dernier¹⁴⁰.

L'influence de ces NCP est généralement difficile à étudier, car il faut réussir à extraire la protéine d'intérêt uniquement, puis à étudier l'activité cellulaire et/ou la croissance minérale. Pour tenter de comprendre le mécanisme de formation osseuse, les chercheurs se sont alors tournés vers des polyélectrolytes synthétiques de substitution. Parmi ceux-là, l'acide polyaspartique, déjà mentionnée, a largement été exploité, du fait de sa structure chargée négativement à pH physiologique mimant grossièrement la structure des NCP, et plus particulièrement des SIBLINGs. Il a été proposé qu'un tel additif complexait les ions calcium induisant une concentration locale des ions permettant la nucléation. L'acide polyaspartique stabiliserait ensuite une phase transitoire appelée PILP ayant un caractère fluide permettant d'incorporer la phase minérale par capillarité dans les zones de gap et d'overlap du collagène¹⁴¹.

5) L'eau

L'eau représente le 3^{ème} composant majoritaire du tissu osseux en masse ($\approx 9\%$). Elle infiltre ce dernier par le biais de porosités interconnectées provenant de l'arrangement tridimensionnel de la matrice collagène avec la phase minérale.

On distingue 3 types d'eau dans la matrice osseuse :

- L'eau « libre » peut circuler librement dans la matrice minéralisée et permet notamment de diffuser nutriments et ions et d'évacuer les déchets cellulaires. Elle compose la majorité de l'eau présente dans le tissu osseux¹⁴².
- L'eau « interstitielle » ou « coquille d'hydratation » est une eau peu mobile car adsorbée à la surface des cristaux d'apatite¹⁴³. Elle fait l'interface entre la phase minérale et la phase cristalline en favorisant la formation de liaisons H et de forces de van der Waals¹⁴⁴. Par ailleurs, Wang *et al.*, sur la base d'expériences cryo-TEM, de WAXS et de RMN à l'état solide, soutiennent que l'eau interstitielle, une fois adsorbée à la couche de surface amorphe, contrôlerait l'orientation du minéral osseux¹¹². Ce type d'eau représente 15 à 30% de l'eau osseuse.
- L'eau incorporée dans le réseau cristallin de l'hydroxyapatite. Cette eau de structure prendrait place dans les sites lacunaires des ions hydroxyles et calcium afin d'assurer la stabilité chimique et mécanique de la structure apatitique probablement en créant des liaisons H avec les ions voisins¹⁴⁵.

6) Biominéralisation osseuse

La description des phases minérales et organiques permet peu à peu de rationaliser le modèle de biominéralisation osseuse. Ce dernier, comme n'importe quel phénomène de cristallisation en voie aqueuse inclut au moins les étapes de nucléation, de croissance et de maturation. Néanmoins, la versatilité du tissu osseux et la présence de nombreuses molécules organiques compliquent grandement l'observation et la compréhension de ces phénomènes.

a) Nucléation homogène

Dans les années 1920, les chercheurs se sont premièrement focalisés sur les conditions de concentration et de pH du fluide extracellulaire. Le pH physiologique étant à pH 7,4 et les concentrations ioniques suffisamment élevées pour être en sursaturation (*Tableau 3*), il était difficile d'expliquer comment les fluides physiologiques pouvaient à la fois être en sursaturation à l'égard de l'hydroxyapatite tout en circulant dans le corps entier sans pour autant déposer de la phase minérale dans tous les tissus non minéralisés. Il a alors été supposé que des phénomènes cellulaires puissent augmenter localement les concentrations en calcium et/ou phosphates induisant la nucléation homogène d'hydroxyapatite à des endroits particuliers, par exemple les os. Cela pourrait provenir, par exemple, de l'hydrolyse d'esters phosphoriques contenus dans le plasma sous l'action d'enzymes, telle que la phosphatase alcaline, relarguant ainsi des ions phosphates de manière localisée^{146,147}.

Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
142	5	1,5	2,5	103	27	1	0,5

Tableau 3. Concentrations en ions inorganiques (en mM) dans le plasma sanguin humain. Proportions tirées d'après Gamble¹⁴⁸.

b) Nucléation hétérogène

Par la suite, les avancées scientifiques, notamment via le développement de la microscopie électronique dans les années 1950, ont permis de localiser le minéral osseux de manière orientée dans les fibrilles de collagène, amenant ainsi le débat vers une nucléation hétérogène¹²³. Cet argument exclut par ailleurs le terme de sursaturation que l'on ne trouve que dans le cas de la nucléation homogène, expliquant ainsi pourquoi l'apatite ne se forme pas sur des tissus non prévus pour. Il commence maintenant à être admis que la nucléation suit un mécanisme hétérogène dans lequel les NCP provoquent la nucléation des cristaux inorganiques directement dans les zones de gap et d'overlap dans les fibrilles de collagène.

c) Mécanisme non-classique de nucléation

Un peu plus tard s'est posée la question de la nature de la phase nucléant dans les fibrilles de collagène. En particulier, le diagramme d'énergie proposé par Mann (Figure 22) suggère que la formation directe de la phase thermodynamiquement la plus stable, l'hydroxyapatite, n'est pas favorable énergétiquement, et que sa formation nécessite une phase intermédiaire cinétiquement stabilisée⁷⁰.

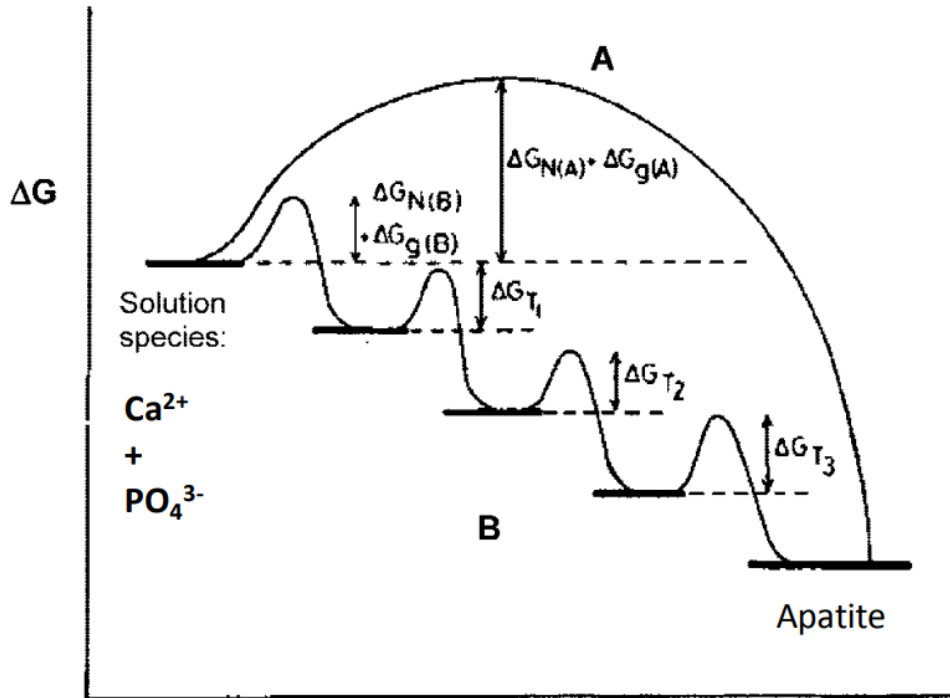


Figure 22 : Diagramme d'énergie au regard de la formation d'hydroxyapatite avec les chemins A et B décrivant respectivement la formation directe d'hydroxyapatite à partir des ions en solution, et la formation préalable d'une phase cinétiquement stabilisée. Image reproduite d'après Mann⁷⁰.

Plusieurs phases intermédiaires ont par la suite été proposées. Termine a identifié que le minéral osseux naissant était principalement du phosphate de calcium amorphe (ACP)¹⁴⁹. Dans cette même période, Posner et Betts découvrent que l'ACP présente un ordre à courte portée suggérant que l'ACP est composé de clusters solides de 9,5 Å en taille¹⁵⁰. C'est à cette époque qu'est suggéré pour la première fois le mécanisme non-classique de cristallisation de l'apatite. Il a été suggéré, sur des arguments de taille et de rapport Ca/P par analyse chimique, que la formule de ce cluster, plus tard appelé cluster de Posner, était $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. Un précurseur amorphe de type ACP a par ailleurs été proposé dans la minéralisation de la nageoire caudale du poisson zèbre⁸³, de la dentine de la souris¹⁵¹ ou du fémur chez le rat¹⁵². D'autre part, Brown propose que la phase transitoire est de l'OCP en se basant sur sa morphologie plaquettaire et sa structure similaire à l'hydroxyapatite¹⁵³. Une telle phase a par exemple été proposée dans la minéralisation du crâne chez le rat¹⁵⁴. Enfin, la phase de brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a aussi été suggérée comme phase transitoire dans la minéralisation du crâne de rat^{154,155}. Encore aujourd'hui, le débat reste ouvert car l'observation de cette phase préliminaire *in vivo* s'avère compliquée, principalement car le minéral osseux se résorbe en permanence et ne se forme pas à un instant bien précis.

d) Phénomène de maturation osseuse

Après les phénomènes de nucléation et de croissance du minéral osseux, celui-ci évolue au cours du temps. Ce phénomène s'appelle la maturation osseuse et traduit une augmentation du domaine cristallin au détriment de la couche de surface amorphe, ainsi qu'une augmentation de la cristallinité du cœur cristallin en son sein.

Ce mécanisme a par exemple été proposé par Glimcher *et al.* qui ont relevé une cristallinité croissante avec le vieillissement d'os d'embryons de poulets par DRX¹⁵⁶. Cela a ensuite été mis en évidence par des expériences de FTIR¹⁵⁷ et de RMN à l'état solide du noyau ³¹P¹⁰⁰ réalisées sur des os et apatites biomimétiques à différents temps de vieillissement détectant le signal croissant des ions PO₄³⁻, CO₃²⁻ et OH⁻ apatitiques de manière concomitante à la décroissance des ions HPO₄²⁻ (Figure 23A). De manière générale, il semblerait que le vieillissement entraîne une augmentation du rapport Ca/P, typiquement de 1,3—1,4 à 1,6—1,7^{105,158}. Enfin, d'autres analyses par DRX ont permis de remarquer l'affinement des raies cristallines en fonction du temps de maturation et de le relier à des tailles grandissantes de cristaux apatitiques *in vitro*¹⁵⁸ et *in vivo*¹⁰⁵ (Figure 23B). La représentation schématique de la maturation osseuse est représentée en Figure 23C.

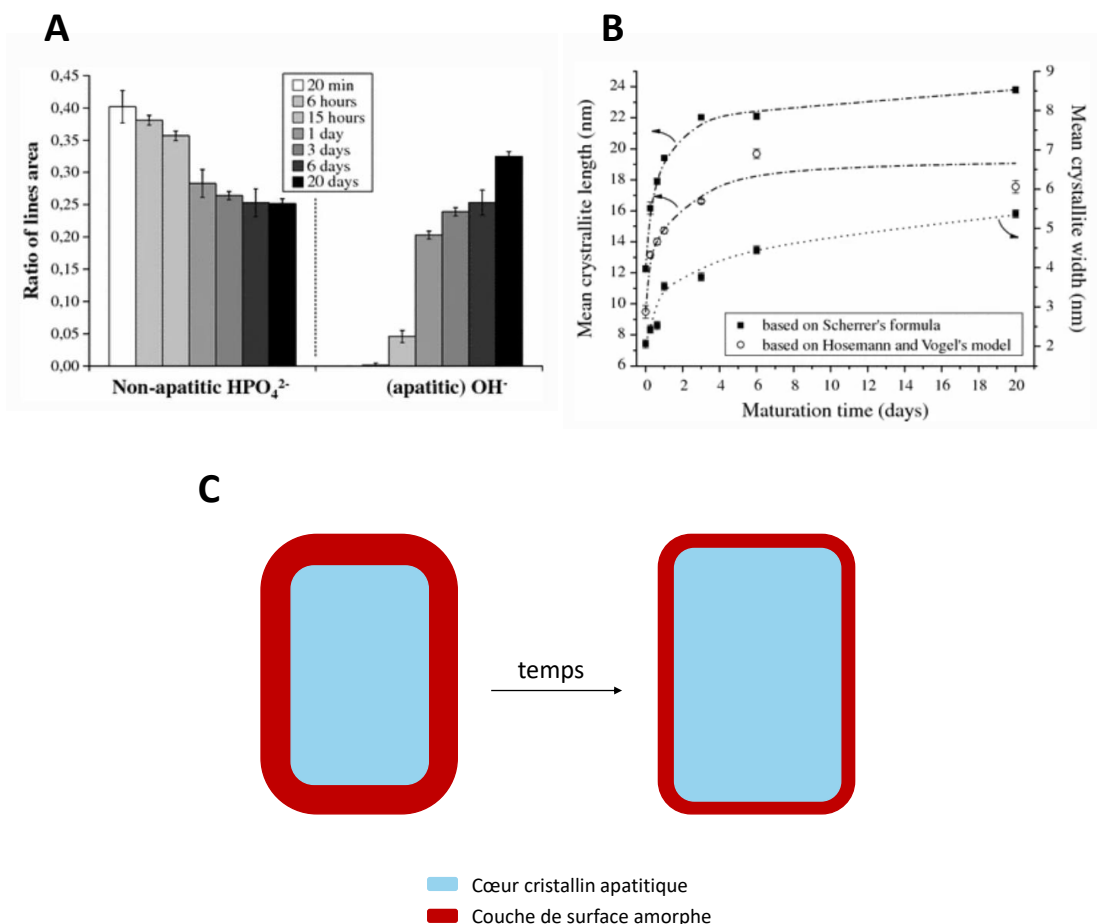


Figure 23 : (A) Variations des ions HPO₄²⁻ et OH⁻ déterminées par FTIR traduisant les proportions respectives des domaines non-apatitiques et apatitiques d'une hydroxyapatite biomimétique en fonction du temps de maturation. (B) Augmentation de la taille du domaine cristallin avec le temps de maturation. (C) Représentation schématique du phénomène de maturation osseuse. Images reproduites d'après Vandecandelaere *et al.*¹⁵⁸.

IV. Modèles de minéralisation *in vitro*

Le recours à l'utilisation de modèles *in vitro* peut s'avérer utile pour étudier la minéralisation osseuse. Dans les paragraphes suivants, nous considérons :

- Les modèles en conditions purement inorganiques
- L'influence de molécules organiques acides
- La minéralisation en présence de collagène
- La description des espèces de prénucléation

1) Modèles inorganiques

Dans cette partie, nous présentons deux types de modèles exploitant 2 stratégies différentes. La première consiste à induire la minéralisation par une remontée de pH provoquée par diffusion de vapeur. Concrètement, une solution contenant du NaH_2PO_4 et du CaCl_2 à pH acide (environ 2,2) est exposée à des vapeurs d'ammoniac. Cette dernière induit une lente montée du pH jusqu'à pH 10 dans la solution de phosphate de calcium. A partir d'une certaine valeur de pH, le système précipite, puis évolue vers une phase d'hydroxyapatite, phase thermodynamiquement stable à partir de pH 7,4¹⁵⁹. L'ajout d'une source d'ions carbonates dans la solution permet notamment d'obtenir *in fine* de l'hydroxyapatite biomimétique¹⁶⁰. Cette méthode de synthèse est très pratique car elle permet d'obtenir cette phase pure relativement rapidement, à température ambiante. Dans ce modèle, le mécanisme permettant d'obtenir de l'hydroxyapatite biomimétique implique le passage par des phases transitoires comme de l'ACP et de l'OCP^{161,162}.

La deuxième stratégie est une simple précipitation induite par mélange de solutions aqueuses, généralement une solution contenant les ions calcium et une solution contenant les ions phosphates. Les conditions de pH, de concentration, de force ionique, de température, et l'ajout d'additifs organiques représentent autant de paramètres pouvant influencer la cinétique de précipitation et les sous-produits obtenus. Ils doivent être bien contrôlés pour que le modèle soit pertinent. Termine et Posner ont répertorié ces différents effets sur la formation d'une phase amorphe sphérique dans des conditions proches de la physiologie¹⁶³ (*i.e.* $7 \leq \text{pH} \leq 8$; $[\text{Ca}^{2+}] \times [\text{P}_i] \leq 91,3 \text{ mM}^2$) et sa transformation en hydroxyapatite¹⁶⁴. Par la suite, Christoffersen *et al.* ont identifié la présence de 2 phases intermédiaires précédant la formation d'apatite dans des conditions de précipitation similaires. Dans leur étude, ils attribuent ces phases comme étant amorphes ayant des morphologies sphériques et floculaires en s'appuyant sur des observations par microscopie électronique en transmission¹⁶⁵. Ces observations TEM semblent en accord avec la proposition de Posner et Betts selon laquelle l'ACP serait composé de clusters solides de tailles nanométriques. Plus récemment, Habraken *et al.*²² vont plus loin dans l'analyse chimique des composés et proposent que la première phase amorphe est composée de clusters solide de postnucléation présentant un rapport Ca/P de $\frac{2}{3}$ dont la charpente de phosphates de calcium suit la formule chimique $[\text{Ca}_2(\text{HPO}_4)_3]^{2-}$ (Figure 24A). C'est la première fois qu'une telle formule est proposée. Elle est notamment justifiée par son étude en solution, à l'état hydraté, car après séchage son rapport Ca/P est estimé à 1,5. Par ailleurs, la deuxième phase transitoire identifiée amorphe dans les études précédentes est attribuée à une phase précurseur de l'OCP, laquelle serait

déficiente en ions Ca^{2+} (Figure 24B). Les auteurs observent ensuite les formations successives de plaquettes d'OCP et d'HAP (Figure 24C).

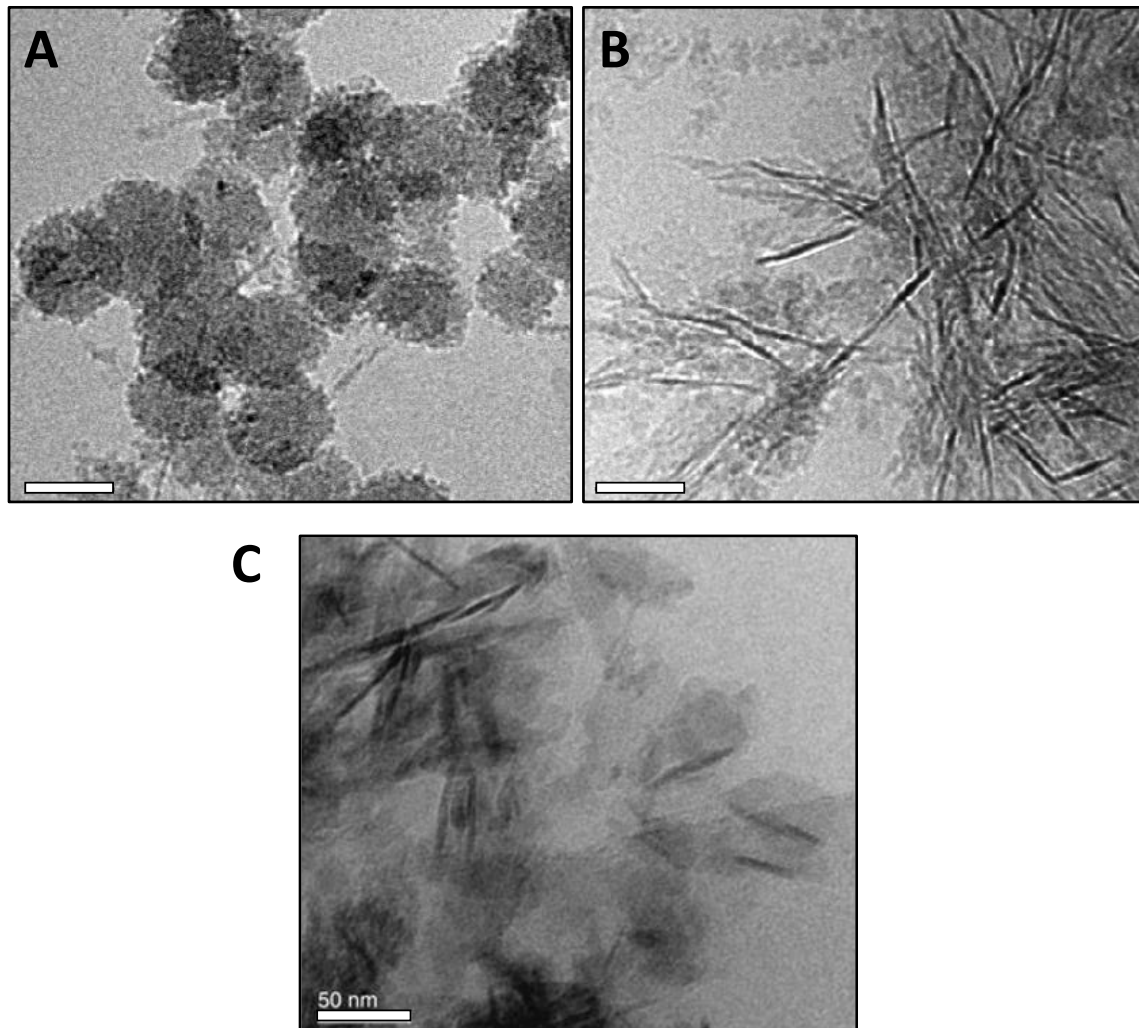


Figure 24 : Observations par cryo-TEM des phases (A) d'ACP, (B) d'OCP déficient en ions calcium et (C) d'HAP. Les solutions ont respectivement été vitrifiées 35 min, 45 min et 1 mois après le début de la réaction. Echelle = 50 nm. Image reproduite d'après Habraken *et al.*²².

Ces deux études modèles permettent de décrire deux mécanismes légèrement différents impliquant une première phase désordonnée évoluant ensuite vers de l'OCP et de l'HAP. Les modèles en conditions purement inorganiques peuvent permettre de comprendre les mécanismes de formation de l'hydroxyapatite, par l'analyse des phases solides transitoires. Il faut toutefois envisager que ces résultats ne sont pas nécessairement transposables aux événements se produisant *in vivo*, car aucune fraction organique n'est considérée.

2) Influence des additifs organiques

En effet, la minéralisation osseuse est fortement suspectée d'être contrôlée par des protéines particulières, les NCP. Parmi celles-ci, les SIBLINGS ou protéines acides sont largement suspectées de pouvoir localiser la nucléation, de la promouvoir ou de l'inhiber. Ainsi, l'influence de pléthores

d'additifs organiques sur la minéralisation d'HAP a été étudiée au fil des années, qu'il s'agisse de petites molécules (acides aminés) ou de polyélectrolytes chargés.

Etudier l'influence des acides aminés sur la minéralisation d'HAP est particulièrement intéressant car il s'agit des briques structurales les plus réduites des protéines. Selon leur nature, ils conduisent à l'observation de différents résultats. Par exemple, Gómez-Morales *et al.* ont étudié l'influence de l'arginine, de l'acide aspartique et de l'alanine représentant respectivement les acides aminés chargés positivement, chargés négativement et hydrophobes sur la phase formée par diffusion de vapeur. Si à chaque fois une phase amorphe sphérique était préalablement observée, l'acide aminé modifiait le pH initial induisant la formation de différents minéraux. En particulier, l'acide aspartique aurait tendance à favoriser la brushite, alors que l'arginine et l'alanine favoriseraient l'OCP et l'HAP à faibles concentrations, comme constaté en l'absence d'additifs¹⁶⁶. Outre cet effet de pH, les acides aminés acides mèneraient à des structures faiblement cristallisées d'HAP dont les dimensions sont limitées par l'adsorption de ces derniers sur la structure minérale naissante. Ils ont par ailleurs la capacité de s'adsorber sur des matrices organiques tout en séquestrant des ions calcium et phosphates, pouvant localiser la nucléation d'HAP et réguler son orientation^{167,168}.

Toutefois, ce sont des protéines, les SIBLINGs, qui sont suspectées de contrôler la nucléation osseuse *in vivo*. Ces protéines ont des structures très complexes, des chaînes longues (34 à 75 kDa, soit entre 300 et 660 acides aminés) et sont noyées dans un océan d'autres protéines (plus de 200 NCP dans la matrice extracellulaire). Il est donc compliqué d'isoler une protéine particulière en grande quantité pour étudier son influence. Les chercheurs se sont alors tournés vers des analogues synthétiques pouvant mimer leurs actions. Ces SIBLINGs ont le point commun d'être riches en résidus acides, c'est donc tout naturellement que les polymères acides, tels que l'acide polyaspartique, typiquement, ou l'acide polyglutamique¹⁶⁹ ou encore l'acide polyacrylique¹⁷⁰ ont été étudiés à cette fin. Le cas de l'acide polyaspartique sera notamment approfondi dans le chapitre VII.

L'ajout d'additifs organiques, tel que l'acide polyaspartique, permet d'observer un mécanisme de précipitation modifié. Comme mentionné précédemment, il a été observé que ce polymère chargé stabilisait une phase de type PILP (Figure 25A). Cette dernière capterait et localiserait les ions jusqu'à provoquer une séparation de phase. La phase PILP formée s'arrangerait en réseaux de nanoparticules solides de 4 à 5 nm en taille relayées par les chaînes polymères comme observé par Xu *et al.* sur le système CaCO₃³⁸. Il est ensuite proposé que cette phase PILP oriente les nanoparticules de manière orientée (Figure 25C) pour former des nano-bâtonnets d'HAP (Figure 25B)¹⁷¹. L'attachement orienté est un mécanisme de croissance cristalline non-classique dans lequel les particules primaires s'attachent les unes aux autres selon une direction préférentielle généralement imposée par la structure cristallographique de ces dernières. Dans le cas de la phase PILP, cela signifie que les nanoparticules minérales ont à un moment donné un certain degré d'ordre. Ce mécanisme serait en accord avec le mécanisme de minéralisation intrafibrillaire du collagène assisté par des PNC.

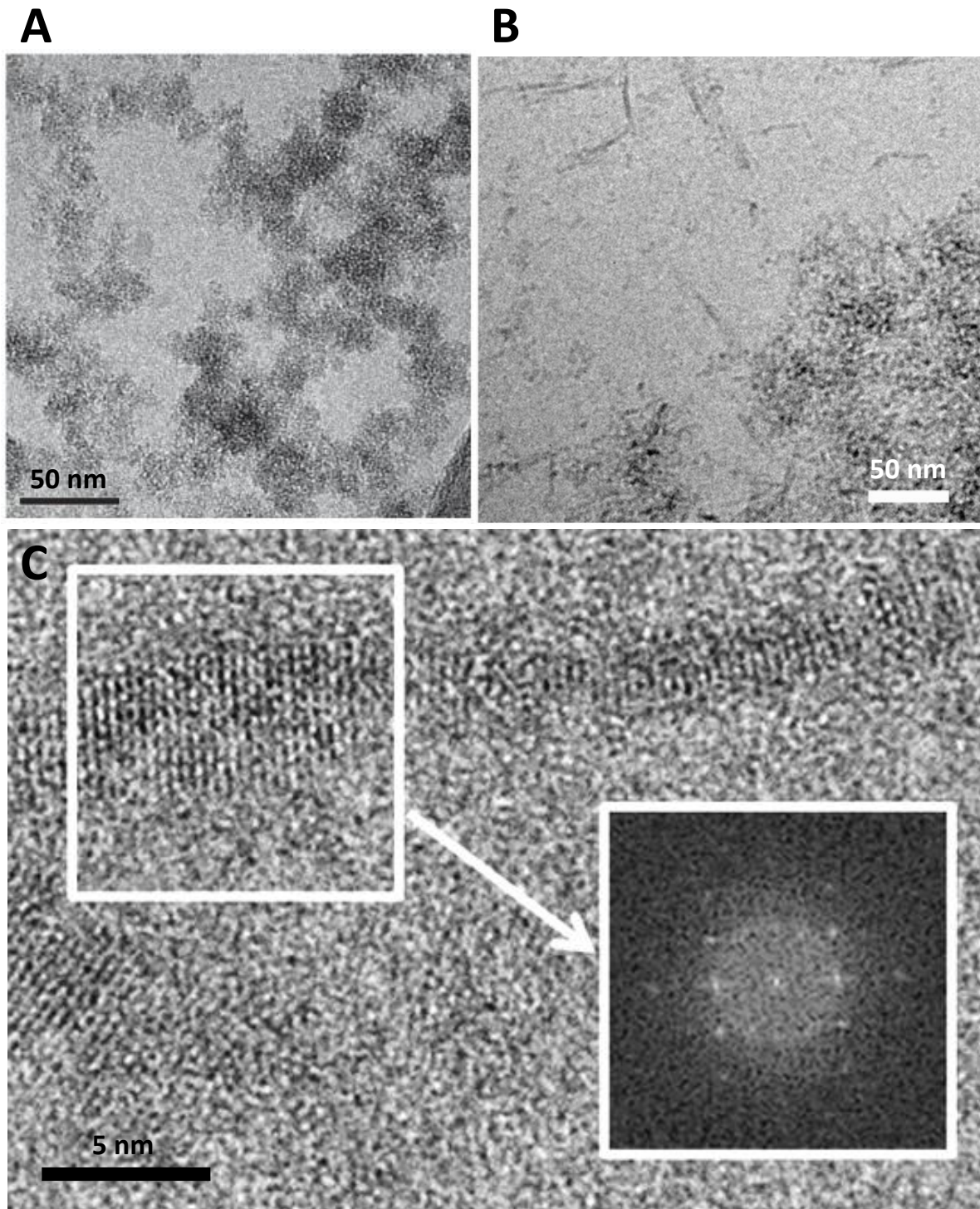


Figure 25 : Observations cryo-TEM de (A) la phase PILP observée dans la précipitation d'HAP et (B) la formation de nano-bâtonnets à proximité de la phase PILP. (C) Cliché HRTEM d'un nano-bâtonnet d'HAP suggérant un phénomène d'attachement orienté. A, B et C sont respectivement reproduits d'après Nudelman *et al.*¹²⁹, Krogstad *et al.*¹⁷¹ et Krogstad *et al.*¹⁷².

3) Les espèces de prénucléation

Nous clôturons cette partie en introduisant le concept de clusters de prénucléation (PNC). Ces derniers ont été observés (Figure 26A) pour la première fois par cryo-TEM en 2010 par Dey *et al.* et consistent en clusters solubles de taille nanométrique ($\approx 0,9$ nm) précédant la nucléation de la phase amorphe dans le cadre de la formation d'HAP. Les PNC semblent s'agréger avec le temps formant des agrégats ramifiés de plusieurs dizaines de nm. Le terme généralisant les PNC individuels et leurs agrégats dans le cadre de ce manuscrit sera « espèces de prénucléation » ou PNS. Dans l'étude de Dey *et al.*, les auteurs utilisent une monocouche d'acide arachidique semblant localiser ces PNS à leur surface. Par la suite, les PNS semblent nucléer en une phase amorphe sphérique de 40 à 80 nm constitués eux-aussi de clusters solides, rappelant la première phase amorphe impliquée dans la formation d'HAP décrite jusqu'à présent. Les auteurs proposent que les PNC sont des clusters de Posner, car les tailles de ces 2 entités sont semblables. La phase amorphe évolue ensuite vers une structure plaquettaire d'HAP¹⁷³.

Quelques années plus tard, Habraken *et al.* observent des objets similaires, aussi par cryo-TEM, mais en conditions purement inorganiques (Figure 26B), suggérant que leur présence est systématique dans des conditions proches de la physiologie. En se basant sur des mesures potentiométriques et des calculs *ab initio*, les auteurs suggèrent que ces clusters solubles sont des ions calcium triphosphate de formule chimique $[\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)]^{3-}$. D'après leurs observations, ces clusters s'agrègent avant de nucléer en une phase amorphe sphérique décrite comme ayant une charpente de phosphate de calcium suivant la formule $[\text{Ca}_2(\text{HPO}_4)_3]^{2-}$. Cette dernière évolue ensuite vers une phase de type OCP déficiente en calcium, évoluant en OCP puis en HAP, comme décrit précédemment²².

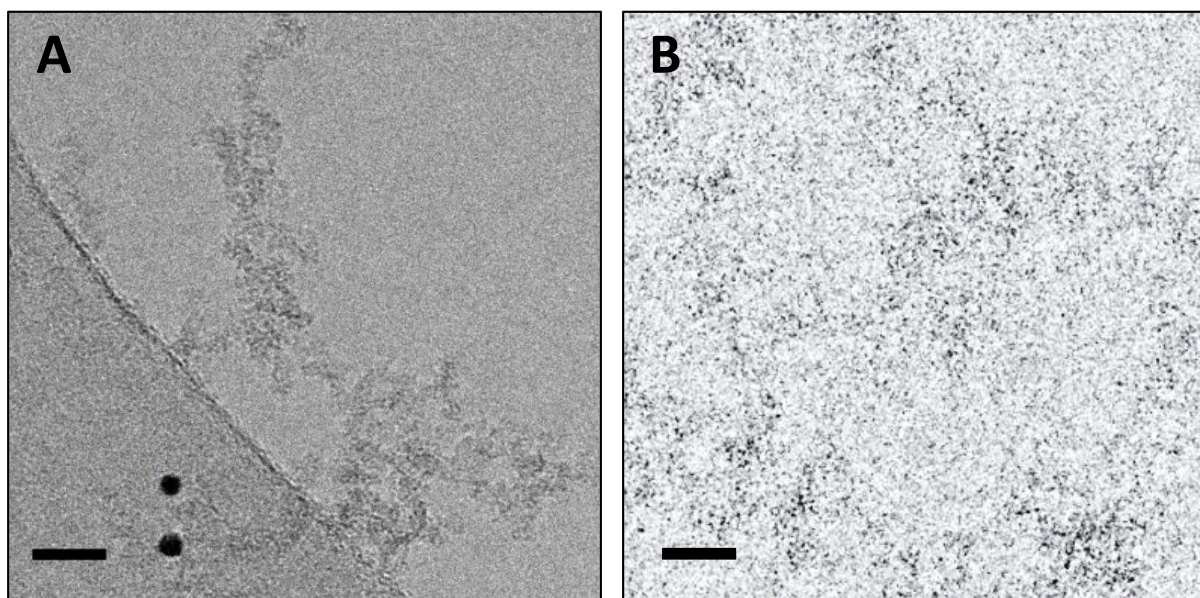


Figure 26 : Observations cryo-TEM des PNS reproduites selon les études de (A) Dey *et al.*¹⁷³ et (B) Habraken *et al.*²². Echelle = 20 nm.

Ces 2 études ouvrent le débat quant à la nature chimique de ces clusters solubles et de la composition des clusters solides supposés être des clusters de Posner jusqu'à présent. Le caractère soluble, la taille nanométrique et le comportement dynamique des PNC rendent leur caractérisation complexe.

Les études portant sur la composition et de la structure des PNC sont principalement basées sur des simulations par dynamique moléculaire. Mancardi *et al.* sont par exemple en accord avec la proposition d'Habraken *et al.* et affinent la composition proposée en ajoutant la contribution de molécules d'eau structurales donnant lieu à la formule $[\text{Ca}(\text{HPO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]^{4-}$, dans laquelle la coordinence du calcium est de 7¹⁷⁴. Une autre étude¹⁷⁵ propose que les paires ioniques CaHPO_4 et leur dimère $[\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2]^{2-}$ sont plus stables que les structures proposées par Habraken *et al.* et Mancardi *et al.*.

Du côté du cluster solide, une étude s'appuyant sur de l'AFM est en accord avec l'hypothèse du cluster de Posner¹⁷⁶. Le modèle est affiné par des mesures XANES, entre autres, proposant l'implication de molécules d'eau structurale conduisant à la formule $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_{30}$, dans laquelle 8 atomes de calcium sont entourés de molécules d'eau, le dernier calcium étant au centre du cluster¹⁷⁷. Plus récemment, des simulations par dynamique moléculaire proposent que ces clusters de Posner sont déficients en ions calcium et peuvent intégrer des cations monovalents dans leur structure¹⁷⁸. D'autre part, des formules s'écartant du cluster de Posner sont aussi proposées. Par exemple, Zhang *et al.* proposent sur la base d'expérience XANES, que les clusters solides les plus abondants dans la formation d'ACP en conditions hydratées (solide mouillé) sont des paires ioniques $\text{Ca}(\eta^2\text{-PO}_4)_2\text{L}_2$ ($\text{L} = \text{H}_2\text{O}$ ou $\eta^1\text{-PO}_4$), où les phosphates pourraient être protonés¹⁷⁹. Enfin, Lin et Chiu combinent spectroscopie infrarouge et calculs *ab initio* pour proposer que beaucoup de structures pourraient être plus stables énergétiquement que le cluster de Posner¹⁸⁰, tels que les clusters de formule $[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2]^{2-}$, $[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3]^{5-}$, ou $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Ainsi, la récente découverte des espèces de prénucléation a bouleversé la vision classique de la nucléation d'HAP. Les PNC ajoutent une dimension qui n'a été que rarement décrite dans la littérature depuis 2010 et posent la question de leur existence *in vivo*. Dans ce cas, les protéines acides et molécules organiques pourraient concentrer ces clusters solubles et induire la nucléation dans la matrice de collagène. En effet, ces PNC pourraient être stabilisées par des additifs tels que l'acide arachidique¹⁷³, des ions citrates¹⁸¹ ou encore l'ostéopontine¹⁸², une protéine de la famille des SIBLINGS, ces 2 dernières études impliquant l'apparition d'une phase PILP *in vitro*. Enfin, ces observations ont remis en question l'hypothèse du cluster solide de Posner comme étant la brique individuelle de l'ACP. La littérature semble indiquer que la nature de l'ACP dépend du milieu à partir duquel il est synthétisé mais aussi de l'état dans lequel on l'analyse. En effet, jusqu'à présent, l'ACP avait été étudié en conditions sèches et présentait un rapport Ca/P de 1,5 qu'Habraken *et al.*²² ont retrouvé dans leur ACP une fois séché, son rapport Ca/P ayant été estimé à 0,67 en conditions humides.

V. Conclusion

La récente détection des PNC *in vitro* suggère que la minéralisation osseuse pourrait aussi suivre un mécanisme non-classique. Ainsi, cette découverte ajoute potentiellement une étape supplémentaire dans le mécanisme suggéré *in vivo* dans lequel une phase amorphe et des phases cristallines transitoires seraient impliquées avant la cristallisation de l'hydroxyapatite. En particulier, les PNC seraient à l'origine de ces phases transitoires. Leur étude permettrait de confirmer ou d'infirmer les modèles existants.

Pour ce faire, nous nous proposons de caractériser les PNC dans le cadre de la formation d'hydroxyapatite *in vitro* dans des conditions proches de la physiologie. Cependant, ces espèces ne sont pas facilement caractérisables, du fait de leur caractère soluble, leur taille nanométrique et leur comportement dynamique, comme en témoignent le faible nombre d'articles scientifiques tentant tant bien que mal de les caractériser. Dans ce travail de thèse, nous appliquons pour la première fois la RMN à la caractérisation structurale des différentes espèces transitoires intervenant avant la cristallisation d'hydroxyapatite. Ainsi, le chapitre suivant vise à présenter les principes et subtilités de cette méthode de caractérisation. Nous développerons par ailleurs les aspects importants de cette technique utilisés dans le cadre de ce travail doctoral.

Références bibliographiques

- (1) Coquerel, G. Crystallization of Molecular Systems from Solution: Phase Diagrams, Supersaturation and Other Basic Concepts. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (7), 2286–2300. <https://doi.org/10.1039/C3CS60359H>.
- (2) Jones, S. F.; Evans, G. M.; Galvin, K. P. Bubble Nucleation from Gas Cavities — a Review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, *80* (1), 27–50. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00074-8](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00074-8).
- (3) Pruppacher, H. R.; Klett, J. D.; Wang, P. K. Microphysics of Clouds and Precipitation. *Aerosol Sci. Technol.* **1998**, *28* (4), 381–382. <https://doi.org/10.1080/02786829808965531>.
- (4) Martin, S. T. Phase Transitions of Aqueous Atmospheric Particles. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (9), 3403–3454. <https://doi.org/10.1021/cr990034t>.
- (5) Kashchiev, D. *Nucleation : Basic Theories with Application*; Elsevier, 2000.
- (6) Bereznoi, A. I. *Glass-Ceramics and Photo-Sitalls*, 1970th edition.; Springer, 2012.
- (7) Reid, R. C. Possible Mechanism for Pressurized-Liquid Tank Explosions or BLEVE's. *Science* **1979**, *203* (4386), 1263–1265. <https://doi.org/10.1126/science.203.4386.1263>.
- (8) Gebauer, D.; Cölfen, H. Prenucleation Clusters and Non-Classical Nucleation. *Nano Today* **2011**, *6* (6), 564–584. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.10.005>.
- (9) Liger-Belair, G.; Vignes-Adler, M.; Voisin, C.; Robillard, B.; Jeandet, P. Kinetics of Gas Discharging in a Glass of Champagne: The Role of Nucleation Sites. *Langmuir* **2002**, *18* (4), 1294–1301. <https://doi.org/10.1021/la0115987>.
- (10) Bergfors, T. Seeds to Crystals. *J. Struct. Biol.* **2003**, *142* (1), 66–76. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(03\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00039-X).
- (11) Gibbs, J. W. On the Equilibrium of Heterogeneous Substances. *Trans. Conn. Acad.* **1877**, *III*, 329.
- (12) Volmer, M.; Weber, A. Keimbildung in übersättigten Gebilden. *Z. Für Phys. Chem.* **1926**, *119U* (1), 277–301. <https://doi.org/10.1515/zpch-1926-11927>.
- (13) Becker, R.; Döring, W. Kinetische Behandlung Der Keimbildung in Übersättigten Dämpfen. *Ann. Phys.* **1935**, *416* (8), 719–752. <https://doi.org/10.1002/andp.19354160806>.
- (14) Frenkel, J. A General Theory of Heterophase Fluctuations and Pretransition Phenomena. *J. Chem. Phys.* **1939**, *7* (7), 538–547. <https://doi.org/10.1063/1.1750484>.
- (15) Frenkel, J. *Kinetic Theory of Liquids*; International series of monographs on physics; Clarendon Press: Oxford, 1946.
- (16) Karthika, S.; Radhakrishnan, T. K.; Kalaichelvi, P. A Review of Classical and Nonclassical Nucleation Theories. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16* (11), 6663–6681. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00794>.
- (17) Chernov, A. A. *Modern Crystallography III*, Crystal Growth.; Springer Series in Solid-State Sciences; Vol. 36.
- (18) Lafferrere, L. NUCLEATION ET TRANSITIONS DE PHASES EN CHIMIE PHARMACEUTIQUE. phdthesis, Université Paul Cézanne - Aix-Marseille III, 2002. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00784677> (accessed 2022-11-24).
- (19) Brus, D.; Ždímal, V.; Smolík, J. Homogeneous Nucleation Rate Measurements in Supersaturated Water Vapor. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129* (17), 174501. <https://doi.org/10.1063/1.3000629>.
- (20) Vekilov, P. G. The Two-Step Mechanism of Nucleation of Crystals in Solution. *Nanoscale* **2010**, *2* (11), 2346–2357. <https://doi.org/10.1039/C0NR00628A>.

- (21) Gebauer, D.; Völkel, A.; Cölfen, H. Stable Prenucleation Calcium Carbonate Clusters. *Science* **2008**, 322 (5909), 1819–1822. <https://doi.org/10.1126/science.1164271>.
- (22) Habraken, W. J. E. M.; Tao, J.; Brylka, L. J.; Friedrich, H.; Bertinetti, L.; Schenk, A. S.; Verch, A.; Dmitrovic, V.; Bomans, P. H. H.; Frederik, P. M.; Laven, J.; Schoot, P. van der; Aichmayer, B.; With, G. de; DeYoreo, J. J.; Sommerdijk, N. A. J. M. Ion-Association Complexes Unite Classical and Non-Classical Theories for the Biomimetic Nucleation of Calcium Phosphate. *Nat. Commun.* **2013**, 4 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms2490>.
- (23) Demichelis, R.; Raiteri, P.; Gale, J. D.; Quigley, D.; Gebauer, D. Stable Prenucleation Mineral Clusters Are Liquid-like Ionic Polymers. *Nat. Commun.* **2011**, 2 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms1604>.
- (24) Gower, L. B.; Odom, D. J. Deposition of Calcium Carbonate Films by a Polymer-Induced Liquid-Precursor (PILP) Process. *J. Cryst. Growth* **2000**, 210 (4), 719–734. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(99\)00749-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(99)00749-6).
- (25) Beniash, E.; Aizenberg, J.; Addadi, L.; Weiner, S. Amorphous Calcium Carbonate Transforms into Calcite during Sea Urchin Larval Spicule Growth. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1997**, 264 (1380), 461–465. <https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0066>.
- (26) Beniash, E.; Metzler, R. A.; Lam, R. S. K.; Gilbert, P. U. P. A. TRANSIENT AMORPHOUS CALCIUM PHOSPHATE IN FORMING ENAMEL. *J. Struct. Biol.* **2009**, 166 (2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.02.001>.
- (27) Li, D.; Nielsen, M. H.; Lee, J. R. I.; Frandsen, C.; Banfield, J. F.; De Yoreo, J. J. Direction-Specific Interactions Control Crystal Growth by Oriented Attachment. *Science* **2012**, 336 (6084), 1014–1018. <https://doi.org/10.1126/science.1219643>.
- (28) Yoreo, J. J. D.; Gilbert, P. U. P. A.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Penn, R. L.; Whitlam, S.; Joester, D.; Zhang, H.; Rimer, J. D.; Navrotsky, A.; Banfield, J. F.; Wallace, A. F.; Michel, F. M.; Meldrum, F. C.; Cölfen, H.; Dove, P. M. Crystallization by Particle Attachment in Synthetic, Biogenic, and Geologic Environments. *Science* **2015**, 349 (6247). <https://doi.org/10.1126/science.aaa6760>.
- (29) Niederberger, M.; Cölfen, H. Oriented Attachment and Mesocrystals: Non-Classical Crystallization Mechanisms Based on Nanoparticle Assembly. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8 (28), 3271–3287. <https://doi.org/10.1039/B604589H>.
- (30) Pacholski, C.; Kornowski, A.; Weller, H. Self-Assembly of ZnO: From Nanodots to Nanorods. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41 (7), 1188–1191. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020402\)41:7<1188::AID-ANIE1188>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020402)41:7<1188::AID-ANIE1188>3.0.CO;2-5).
- (31) Calderone, V. R.; Testino, A.; Buscaglia, M. T.; Bassoli, M.; Bottino, C.; Viviani, M.; Buscaglia, V.; Nanni, P. Size and Shape Control of SrTiO₃ Particles Grown by Epitaxial Self-Assembly. *Chem. Mater.* **2006**, 18 (6), 1627–1633. <https://doi.org/10.1021/cm0525961>.
- (32) Nagasawa, H. The Crustacean Cuticle: Structure, Composition and Mineralization. *Front. Biosci. Elite Ed.* **2012**, 4 (2), 711–720. <https://doi.org/10.2741/e412>.
- (33) Hemantaranjan, A. *Advances in Plant Physiology (Vol. 7)*; Scientific Publishers, 2005.
- (34) Gilbert, P. U. P. A.; Porter, S. M.; Sun, C.-Y.; Xiao, S.; Gibson, B. M.; Shenkar, N.; Knoll, A. H. Biomineralization by Particle Attachment in Early Animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, 116 (36), 17659–17665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902273116>.
- (35) Gebauer, D.; Raiteri, P.; Gale, J. D.; Cölfen, H. On Classical and Non-Classical Views on Nucleation. *Am. J. Sci.* **2018**, 318 (9), 969–988. <https://doi.org/10.2475/09.2018.05>.

- (36) Svedberg, T.; Fåhræus, R. A NEW METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE MOLECULAR WEIGHT OF THE PROTEINS. *J. Am. Chem. Soc.* **1926**, *48* (2), 430–438. <https://doi.org/10.1021/ja01413a019>.
- (37) Pouget, E. M.; Bomans, P. H. H.; Goos, J. A. C. M.; Frederik, P. M.; With, G. de; Sommerdijk, N. A. J. M. The Initial Stages of Template-Controlled CaCO₃ Formation Revealed by Cryo-TEM. *Science* **2009**, *323* (5920), 1455–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1169434>.
- (38) Xu, Y.; Tijssen, K. C. H.; Bomans, P. H. H.; Akiva, A.; Friedrich, H.; Kentgens, A. P. M.; Sommerdijk, N. A. J. M. Microscopic Structure of the Polymer-Induced Liquid Precursor for Calcium Carbonate. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 2582. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05006-w>.
- (39) Duchstein, P.; Schodder, P. I.; Leupold, S.; Dao, T. Q. N.; Kababya, S.; Cicconi, M. R.; de Ligny, D.; Pipich, V.; Eike, D.; Schmidt, A.; Zahn, D.; Wolf, S. E. Small-Molecular-Weight Additives Modulate Calcification by Interacting with Prenucleation Clusters on the Molecular Level**. *Angew. Chem.* **2022**, *134* (40), e202208475. <https://doi.org/10.1002/ange.202208475>.
- (40) Faatz, M.; Gröhn, F.; Wegner, G. Amorphous Calcium Carbonate: Synthesis and Potential Intermediate in Biomineralization. *Adv. Mater.* **2004**, *16* (12), 996–1000. <https://doi.org/10.1002/adma.200306565>.
- (41) Rieger, J.; Frechen, T.; Cox, G.; Heckmann, W.; Schmidt, C.; Thieme, J. Precursor Structures in the Crystallization/Precipitation Processes of CaCO₃ and Control of Particle Formation by Polyelectrolytes. *Faraday Discuss.* **2007**, *136* (0), 265–277. <https://doi.org/10.1039/B701450C>.
- (42) Wolf, S. E.; Leiterer, J.; Kappl, M.; Emmerling, F.; Tremel, W. Early Homogenous Amorphous Precursor Stages of Calcium Carbonate and Subsequent Crystal Growth in Levitated Droplets. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (37), 12342–12347. <https://doi.org/10.1021/ja800984y>.
- (43) Wolf, S. E.; Gower, L. B. Challenges and Perspectives of the Polymer-Induced Liquid-Precursor Process: The Pathway from Liquid-Condensed Mineral Precursors to Mesocrystalline Products. In *New Perspectives on Mineral Nucleation and Growth: From Solution Precursors to Solid Materials*; Van Driessche, A. E. S., Kellermeier, M., Benning, L. G., Gebauer, D., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 43–75. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45669-0_3.
- (44) Zou, Z.; Polishchuk, I.; Bertinetti, L.; Pokroy, B.; Politi, Y.; Fratzl, P.; Habraken, W. J. E. M. Additives Influence the Phase Behavior of Calcium Carbonate Solution by a Cooperative Ion-Association Process. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (3), 449–457. <https://doi.org/10.1039/C7TB03170J>.
- (45) Avaro, J. T.; Wolf, S. L. P.; Hauser, K.; Gebauer, D. Stable Prenucleation Calcium Carbonate Clusters Define Liquid–Liquid Phase Separation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (15), 6155–6159. <https://doi.org/10.1002/anie.201915350>.
- (46) Gebauer, D.; Gunawidjaja, P. N.; Ko, J. Y. P.; Bacsik, Z.; Aziz, B.; Liu, L.; Hu, Y.; Bergström, L.; Tai, C.-W.; Sham, T.-K.; Edén, M.; Hedin, N. Proto-Calcite and Proto-Vaterite in Amorphous Calcium Carbonates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (47), 8889–8891. <https://doi.org/10.1002/anie.201003220>.
- (47) Farhadi-Khouzani, M.; Chevrier, D. M.; Zhang, P.; Hedin, N.; Gebauer, D. Water as the Key to Proto-Aragonite Amorphous CaCO₃. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (28), 8117–8120. <https://doi.org/10.1002/anie.201603176>.
- (48) Ihli, J.; Wong, W. C.; Noel, E. H.; Kim, Y.-Y.; Kulak, A. N.; Christenson, H. K.; Duer, M. J.; Meldrum, F. C. Dehydration and Crystallization of Amorphous Calcium Carbonate in Solution and in Air. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1), 3169. <https://doi.org/10.1038/ncomms4169>.

- (49) Nielsen, M. H.; Aloni, S.; De Yoreo, J. J. In Situ TEM Imaging of CaCO₃ Nucleation Reveals Coexistence of Direct and Indirect Pathways. *Science* **2014**, *345* (6201), 1158–1162. <https://doi.org/10.2307/24917428>.
- (50) Gebauer, D. How Can Additives Control the Early Stages of Mineralisation? *Minerals* **2018**, *8* (5), 179. <https://doi.org/10.3390/min8050179>.
- (51) Gebauer, D.; Wolf, S. E. Designing Solid Materials from Their Solute State: A Shift in Paradigms toward a Holistic Approach in Functional Materials Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (11), 4490–4504. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b13231>.
- (52) Franceschi, V. Calcium Oxalate in Plants. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6* (7), 331. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02014-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02014-3).
- (53) Pak, C. Y. C. Chapter 25 - Kidney Stones: Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy. In *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders (Third Edition)*; Avioli, L. V., Krane, S. M., Eds.; Academic Press: San Diego, 1998; pp 739–758. <https://doi.org/10.1016/B978-012068700-8/50026-8>.
- (54) Ruiz-Agudo, E.; Burgos-Cara, A.; Ruiz-Agudo, C.; Ibañez-Velasco, A.; Cölfen, H.; Rodríguez-Navarro, C. A Non-Classical View on Calcium Oxalate Precipitation and the Role of Citrate. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 768. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00756-5>.
- (55) Lowenstam, H. A.; Weiner, S. Cnidaria. In *On Biomineralization*; Lowenstam, H. A., Weiner, S., Eds.; Oxford University Press, 1989; p 0. <https://doi.org/10.1093/oso/9780195049770.003.0007>.
- (56) Wang, Y.-W.; Kim, Y.-Y.; Christenson, H. K.; Meldrum, F. C. A New Precipitation Pathway for Calcium Sulfate Dihydrate (Gypsum) via Amorphous and Hemihydrate Intermediates. *Chem. Commun.* **2011**, *48* (4), 504–506. <https://doi.org/10.1039/C1CC14210K>.
- (57) Stawski, T. M.; van Driessche, A. E. S.; Ossorio, M.; Diego Rodríguez-Blanco, J.; Besselink, R.; Benning, L. G. Formation of Calcium Sulfate through the Aggregation of Sub-3 Nanometre Primary Species. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11177. <https://doi.org/10.1038/ncomms11177>.
- (58) Li, H.-J.; Yan, D.; Cai, H.-Q.; Yi, H.-B.; Min, X.-B.; Xia, F.-F. Insights into Water-Mediated Ion Clustering in Aqueous CaSO₄ Solutions: Pre-Nucleation Cluster Characteristics Studied by Ab Initio Calculations and Molecular Dynamics Simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (18), 11390–11403. <https://doi.org/10.1039/C7CP00428A>.
- (59) Scheck, J.; Wu, B.; Drechsler, M.; Rosenberg, R.; Van Driessche, A. E. S.; Stawski, T. M.; Gebauer, D. The Molecular Mechanism of Iron(III) Oxide Nucleation. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7* (16), 3123–3130. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.6b01237>.
- (60) Zhang, H.; Waychunas, G. A.; Banfield, J. F. Molecular Dynamics Simulation Study of the Early Stages of Nucleation of Iron Oxyhydroxide Nanoparticles in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (33), 10630–10642. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.5b03801>.
- (61) Reichenbach, J.; Wynne, K. Frustration vs Prenucleation: Understanding the Surprising Stability of Supersaturated Sodium Thiosulfate Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (30), 7590–7596. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.8b04112>.
- (62) Carcouët, C. C. M. C.; van de Put, M. W. P.; Mezari, B.; Magusin, P. C. M. M.; Laven, J.; Bomans, P. H. H.; Friedrich, H.; Esteves, A. C. C.; Sommerdijk, N. A. J. M.; van Benthem, R. A. T. M.; de With, G. Nucleation and Growth of Monodisperse Silica Nanoparticles. *Nano Lett.* **2014**, *14* (3), 1433–1438. <https://doi.org/10.1021/nl404550d>.
- (63) Wolf, S. E.; Müller, L.; Barrea, R.; Kampf, C. J.; Leiterer, J.; Panne, U.; Hoffmann, T.; Emmerling, F.; Tremel, W. Carbonate-Coordinated Metal Complexes Precede the Formation of Liquid

- Amorphous Mineral Emulsions of Divalent Metal Carbonates. *Nanoscale* **2011**, 3 (3), 1158–1165. <https://doi.org/10.1039/C0NR00761G>.
- (64) Kellermeier, M.; Rosenberg, R.; Moise, A.; Anders, U.; Przybylski, M.; Cölfen, H. Amino Acids Form Prenucleation Clusters: ESI-MS as a Fast Detection Method in Comparison to Analytical Ultracentrifugation. *Faraday Discuss.* **2013**, 159 (0), 23–45. <https://doi.org/10.1039/C2FD20060K>.
- (65) Zhou, J.; Zhou, Y.; Tang, W. Molecular Mechanism of Organic Crystal Nucleation: A Perspective of Solution Chemistry and Polymorphism. *Crystals* **2022**, 12 (7), 980. <https://doi.org/10.3390/cryst12070980>.
- (66) Lowenstam, H. A. Minerals Formed by Organisms. *Science* **1981**, 211 (4487), 1126–1131. <https://doi.org/10.1126/science.7008198>.
- (67) Lowenstam, H. A.; Weiner, S. *On Biomineralization*; Oxford University Press, 1989.
- (68) Frankel, R. B. Iron Biominerals: An Overview. In *Iron Biominerals*; Frankel, R. B., Blakemore, R. P., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1991; pp 1–6. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3810-3_1.
- (69) Estroff, L. A. Introduction: Biomineralization. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (11), 4329–4331. <https://doi.org/10.1021/cr8004789>.
- (70) Mann, S. Mineralization in Biological Systems. In *Inorganic Elements in Biochemistry*; Connett, P. H., Folmann, H., Lammers, M., Mann, S., Odom, J. D., Wetterhahn, K. E., Eds.; Structure and Bonding; Springer: Berlin, Heidelberg, 1983; pp 125–174. <https://doi.org/10.1007/BFb0111320>.
- (71) Beveridge, T. J. Role of Cellular Design in Bacterial Metal Accumulation and Mineralization. *Annu. Rev. Microbiol.* **1989**, 43, 147–171. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.43.100189.001051>.
- (72) Borowitzka, M. A. Morphological and Cytological Aspects of Algal Calcification. In *International Review of Cytology*; Bourne, G. H., Danielli, J. F., Jeon, K. W., Eds.; Academic Press, 1982; Vol. 74, pp 127–162. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61171-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61171-7).
- (73) *Biomineralization: From Nature to Application, Volume 4*, 1st edition.; Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. K. O., Eds.; Wiley: Chichester, 2008.
- (74) Bridoux, M. C.; Keil, R. G.; Ingalls, A. E. Analysis of Natural Diatom Communities Reveals Novel Insights into the Diversity of Long Chain Polyamine (LCPA) Structures Involved in Silica Precipitation. *Org. Geochem.* **2012**, 47, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2012.02.010>.
- (75) Falini, G.; Fermani, S. Chitin Mineralization. *Tissue Eng.* **2004**, 10 (1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1089/107632704322791646>.
- (76) Zapanta LeGeros, R. Apatites in Biological Systems. *Prog. Cryst. Growth Charact.* **1981**, 4 (1), 1–45. [https://doi.org/10.1016/0146-3535\(81\)90046-0](https://doi.org/10.1016/0146-3535(81)90046-0).
- (77) Sroga, G. E.; Karim, L.; Colón, W.; Vashishth, D. Biochemical Characterization of Major Bone-Matrix Proteins Using Nanoscale-Size Bone Samples and Proteomics Methodology*. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, 10 (9), M110.006718. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.006718>.
- (78) de Jong, W. F. La Substance Minérale Dans Les Os. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1926**, 45 (6), 445–448. <https://doi.org/10.1002/recl.19260450613>.

- (79) LeGeros, R. Z.; Legeros, J. P. Phosphate Minerals in Human Tissues. In *Phosphate Minerals*; Nriagu, J. O., Moore, P. B., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 1984; pp 351–385. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61736-2_12.
- (80) Daudon, M.; Traxer, O.; Jungers, P.; Bazin, D. Stone Morphology Suggestive of Randall's Plaque. *AIP Conf. Proc.* **2007**, *900* (1), 26–34. <https://doi.org/10.1063/1.2723556>.
- (81) Jantou-Morris, V.; Horton, M. A.; McComb, D. W. The Nano-Morphological Relationships between Apatite Crystals and Collagen Fibrils in Ivory Dentine. *Biomaterials* **2010**, *31* (19), 5275–5286. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.025>.
- (82) Chapman, D. I. Antlers–Bones of Contention. *Mammal Rev.* **1975**, *5* (4), 121–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1975.tb00194.x>.
- (83) Mahamid, J.; Sharir, A.; Addadi, L.; Weiner, S. Amorphous Calcium Phosphate Is a Major Component of the Forming Fin Bones of Zebrafish: Indications for an Amorphous Precursor Phase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (35), 12748–12753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803354105>.
- (84) Amini, S.; Tadayon, M.; Loke, J. J.; Kumar, A.; Kanagavel, D.; Ferrand, H. L.; Duchamp, M.; Raida, M.; Sobota, R. M.; Chen, L.; Hoon, S.; Miserez, A. A Diecast Mineralization Process Forms the Tough Mantis Shrimp Dactyl Club. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (18), 8685–8692. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816835116>.
- (85) Piccoli, P. M.; Candela, P. A. Apatite in Igneous Systems. *Rev. Mineral. Geochem.* **2002**, *48* (1), 255–292. <https://doi.org/10.2138/rmg.2002.48.6>.
- (86) Raimbault, L.; Baumer, A.; Dubru, M.; Benkerrou, C.; Croze, V.; Zahm, A. REE Fractionation between Scheelite and Apatite in Hydrothermal Conditions. *Am. Mineral.* **1993**, *78* (11–12), 1275–1285.
- (87) Kay, M. I.; Young, R. A.; Posner, A. S. Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature* **1964**, *204* (4963), 1050–1052. <https://doi.org/10.1038/2041050a0>.
- (88) Zilm, M. E.; Chen, L.; Sharma, V.; McDannald, A.; Jain, M.; Ramprasad, R.; Wei, M. Hydroxyapatite Substituted by Transition Metals: Experiment and Theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (24), 16457–16465. <https://doi.org/10.1039/C6CP00474A>.
- (89) Yesinowski, J. P.; Eckert, H. Hydrogen Environments in Calcium Phosphates: Proton MAS NMR at High Spinning Speeds. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (21), 6274–6282. <https://doi.org/10.1021/ja00255a009>.
- (90) Rothwell, W. P.; Waugh, J. S.; Yesinowski, J. P. High-Resolution Variable-Temperature Phosphorus-31 NMR of Solid Calcium Phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (8), 2637–2643. <https://doi.org/10.1021/ja00528a020>.
- (91) Laurencin, D.; Wong, A.; Dupree, R.; Smith, M. E. Natural Abundance ⁴³Ca Solid-State NMR Characterisation of Hydroxyapatite: Identification of the Two Calcium Sites. *Magn. Reson. Chem. MRC* **2008**, *46* (4), 347–350. <https://doi.org/10.1002/mrc.2117>.
- (92) Pan, Y.; Fleet, M. E. Compositions of the Apatite-Group Minerals: Substitution Mechanisms and Controlling Factors. *Rev. Mineral. Geochem.* **2002**, *48* (1), 13–49. <https://doi.org/10.2138/rmg.2002.48.2>.
- (93) Beuvelot, J. Biomimétisme, Cytocompatibilité et Cytodynamique. phdthesis, Université d'Angers, 2010. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00542399> (accessed 2022-11-18).
- (94) Elliott, J. C. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*; Elsevier Science, 1994.

- (95) Wopenka, B.; Pasteris, J. D. A Mineralogical Perspective on the Apatite in Bone. *Mater. Sci. Eng. C* **2005**, *25* (2), 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.008>.
- (96) Suetsugu, Y.; Takahashi, Y.; Okamura, F. P.; Tanaka, J. Structure Analysis of A-Type Carbonate Apatite by a Single-Crystal X-Ray Diffraction Method. *J. Solid State Chem.* **2000**, *155* (2), 292–297. <https://doi.org/10.1006/jssc.2000.8887>.
- (97) Boskey, A. L. A - Natural and Synthetic Hydroxyapatites. In *Biomaterials Science (Third Edition)*; Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E., Eds.; Academic Press, 2013; pp 151–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00017-6>.
- (98) Wang, Y.; Euw, S. V.; Laurent, G.; Crevant, C.; Bonhomme-Coury, L.; Giraud-Guille, M.-M.; Babonneau, F.; Nassif, N.; Azaïs, T. Impact of Collagen Confinement vs. Ionic Substitutions on the Local Disorder in Bone and Biomimetic Apatites. *Mater. Horiz.* **2014**, *1* (2), 224–231. <https://doi.org/10.1039/C3MH00071K>.
- (99) Wu, Y.; Ackerman, J. L.; Kim, H.-M.; Rey, C.; Barroug, A.; Glimcher, M. J. Nuclear Magnetic Resonance Spin-Spin Relaxation of the Crystals of Bone, Dental Enamel, and Synthetic Hydroxyapatites. *J. Bone Miner. Res.* **2002**, *17* (3), 472–480. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.3.472>.
- (100) Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Sfihi, H.; Barroug, A. Physico-Chemical Properties of Nanocrystalline Apatites: Implications for Biominerals and Biomaterials. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27* (2), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.015>.
- (101) Von Euw, S.; Ajili, W.; Chan-Chang, T.-H.-C.; Delices, A.; Laurent, G.; Babonneau, F.; Nassif, N.; Azaïs, T. Amorphous Surface Layer versus Transient Amorphous Precursor Phase in Bone – A Case Study Investigated by Solid-State NMR Spectroscopy. *Acta Biomater.* **2017**, *59*, 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.040>.
- (102) Jäger, C.; Welzel, T.; Meyer-Zaika, W.; Epple, M. A Solid-State NMR Investigation of the Structure of Nanocrystalline Hydroxyapatite. *Magn. Reson. Chem. MRC* **2006**, *44* (6), 573–580. <https://doi.org/10.1002/mrc.1774>.
- (103) Huang, S.-J.; Tsai, Y.-L.; Lee, Y.-L.; Lin, C.-P.; Chan, J. C. C. Structural Model of Rat Dentin Revisited. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (13), 2583–2585. <https://doi.org/10.1021/cm9006537>.
- (104) Drouet, C.; Carayon, M.-T.; Combes, C.; Rey, C. Surface Enrichment of Biomimetic Apatites with Biologically-Active Ions Mg²⁺ and Sr²⁺: A Preamble to the Activation of Bone Repair Materials. *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, *28* (8), 1544–1550. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.04.011>.
- (105) Legros, R.; Balmain, N.; Bonel, G. Age-Related Changes in Mineral of Rat and Bovine Cortical Bone. *Calcif. Tissue Int.* **1987**, *41* (3), 137–144. <https://doi.org/10.1007/BF02563793>.
- (106) Pasteris, J.; Wopenka, B.; Valsami-Jones, E. Bone and Tooth Mineralization: Why Apatite? *Elements* **2008**, *4* (2), 97–104. <https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.4.2.97>.
- (107) Combes, C.; Rey, C. Biomimétisme et Biocéramiques. *L'Actualité Chim.* **2003**, No. 7, 16–26.
- (108) Kuhn, L. T. Bone Mineralization. In *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*; Buschow, K. H. J., Cahn, R. W., Flemings, M. C., Ilshner, B., Kramer, E. J., Mahajan, S., Veyssièrre, P., Eds.; Elsevier: Oxford, 2001; pp 787–794. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043152-6/00151-0>.
- (109) Von Euw, S.; Chan-Chang, T.-H.-C.; Paquis, C.; Haye, B.; Pehau-Arnaudet, G.; Babonneau, F.; Azaïs, T.; Nassif, N. Organization of Bone Mineral: The Role of Mineral–Water Interactions. *Geosciences* **2018**, *8* (12), 466. <https://doi.org/10.3390/geosciences8120466>.

- (110) Kalaiselvi, V.; Mathammal, R.; Anitha, P. Sol-Gel Mediated Synthesis of Pure Hydroxyapatite at Different Temperatures and Silver Substituted Hydroxyapatite for Biomedical Applications. *J. Biotechnol. Biomater.* **2017**, *07*. <https://doi.org/10.4172/2155-952X.1000275>.
- (111) Eichert, D.; Sfihi, H.; Combes, C.; Rey, C. Specific Characteristics of Wet Nanocrystalline Apatites. Consequences on Biomaterials and Bone Tissue. *Key Eng. Mater.* **2004**, *254–256*, 927–930. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.254-256.927>.
- (112) Wang, Y.; Von Euw, S.; Fernandes, F. M.; Cassaignon, S.; Selmane, M.; Laurent, G.; Pehau-Arnaudet, G.; Coelho, C.; Bonhomme-Courty, L.; Giraud-Guille, M.-M.; Babonneau, F.; Azaïs, T.; Nassif, N. Water-Mediated Structuring of Bone Apatite. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (12), 1144–1153. <https://doi.org/10.1038/nmat3787>.
- (113) Robin, M. Etude du front de minéralisation du tissu osseux et des modèles biomimétiques associés. phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01907278> (accessed 2022-11-20).
- (114) Engel, J. Versatile Collagens in Invertebrates. *Science* **1997**, *277* (5333), 1785–1786. <https://doi.org/10.1126/science.277.5333.1785>.
- (115) Hanson, D. A.; Eyre, D. R. Molecular Site Specificity of Pyridinoline and Pyrrole Cross-Links in Type I Collagen of Human Bone *. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (43), 26508–26516. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.43.26508>.
- (116) Bailey, A. J.; Paul, R. G.; Knott, L. Mechanisms of Maturation and Ageing of Collagen. *Mech. Ageing Dev.* **1998**, *106* (1), 1–56. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(98\)00119-5](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00119-5).
- (117) Woodhead-Galloway, J. *Collagen: The Anatomy of a Protein*; Institute of Biology's studies in biology; E. Arnold: London, 1980.
- (118) Prockop, D. J.; Kivirikko, K. I. Heritable Diseases of Collagen. *N. Engl. J. Med.* **1984**, *311* (6), 376–386. <https://doi.org/10.1056/NEJM198408093110606>.
- (119) Landis, W. J. A Study of Calcification in the Leg Tendons from the Domestic Turkey. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **1986**, *94* (3), 217–238. [https://doi.org/10.1016/0889-1605\(86\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0889-1605(86)90069-8).
- (120) Holmes, D. F.; Gilpin, C. J.; Baldock, C.; Ziese, U.; Koster, A. J.; Kadler, K. E. Corneal Collagen Fibril Structure in Three Dimensions: Structural Insights into Fibril Assembly, Mechanical Properties, and Tissue Organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (13), 7307–7312. <https://doi.org/10.1073/pnas.111150598>.
- (121) Hodge, A. J.; Petruska, J. A. Recent Studies with the Electron Microscope on Ordered Aggregates of the Tropocollagen Macromolecule. *G N Ramachandran Ed. Asp. Protein Struct. Proc. Symp. P* **1963**.
- (122) Gelse, K.; Pöschl, E.; Aigner, T. Collagens—Structure, Function, and Biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55* (12), 1531–1546. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>.
- (123) Robison, R. A.; Watson, M. L. Collagen-Crystal Relationships in Bone as Seen in the Electron Microscope. *Anat. Rec.* **1952**, *114* (3), 383–409. <https://doi.org/10.1002/ar.1091140302>.
- (124) GLIMCHER, M. J. Molecular Biology of Mineralized Tissues with Particular Reference to Bone. *Rev. Mod. Phys.* **1959**, *31* (2), 359–393. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.31.359>.
- (125) Rho, J.-Y.; Kuhn-Spearing, L.; Zioupos, P. Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone. *Med. Eng. Phys.* **1998**, *20* (2), 92–102. [https://doi.org/10.1016/S1350-4533\(98\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S1350-4533(98)00007-1).

- (126) Ritchie, R.; Buehler, M.; Hansma, P. Plasticity and Toughness in Bone. *Phys. Today - PHYS TODAY* **2009**, *62*. <https://doi.org/10.1063/1.3156332>.
- (127) Reznikov, N.; Bilton, M.; Lari, L.; Stevens, M. M.; Kröger, R. Fractal-like Hierarchical Organization of Bone Begins at the Nanoscale. *Science* **2018**, *360* (6388), eaao2189. <https://doi.org/10.1126/science.aao2189>.
- (128) Wang, Y.; Azaïs, T.; Robin, M.; Vallée, A.; Catania, C.; Legriél, P.; Pehau-Arnaudet, G.; Babonneau, F.; Giraud-Guille, M.-M.; Nassif, N. The Predominant Role of Collagen in the Nucleation, Growth, Structure and Orientation of Bone Apatite. *Nat. Mater.* **2012**, *11* (8), 724–733. <https://doi.org/10.1038/nmat3362>.
- (129) Nudelman, F.; Pieterse, K.; George, A.; Bomans, P. H. H.; Friedrich, H.; Brylka, L. J.; Hilbers, P. A. J.; de With, G.; Sommerdijk, N. A. J. M. The Role of Collagen in Bone Apatite Formation in the Presence of Hydroxyapatite Nucleation Inhibitors. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (12), 1004–1009. <https://doi.org/10.1038/nmat2875>.
- (130) Thula, T. T.; Rodriguez, D. E.; Lee, M. H.; Pendi, L.; Podschun, J.; Gower, L. B. In Vitro Mineralization of Dense Collagen Substrates: A Biomimetic Approach toward the Development of Bone-Graft Materials. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (8), 3158–3169. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.04.014>.
- (131) Deshpande, A. S.; Beniash, E. Bioinspired Synthesis of Mineralized Collagen Fibrils. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8* (8), 3084–3090. <https://doi.org/10.1021/cg800252f>.
- (132) Ashton, B. A.; Höhling, H.-J.; Triffitt, J. T. Plasma Proteins Present in Human Cortical Bone: Enrichment of TheaHS-Glycoprotein. *Calcif. Tissue Res.* **1977**, *22* (1), 27–33. <https://doi.org/10.1007/BF02010343>.
- (133) Delmas, P. D.; Tracy, R. P.; Riggs, B. L.; Mann, K. G. Identification of the Noncollagenous Proteins of Bovine Bone by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Calcif. Tissue Int.* **1984**, *36* (1), 308–316. <https://doi.org/10.1007/BF02405335>.
- (134) Kjellén, L.; Lindahl, U. Proteoglycans: Structures and Interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60* (1), 443–475. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.002303>.
- (135) Hauschka, P. V.; Reid, M. L. Timed Appearance of a Calcium-Binding Protein Containing γ -Carboxyglutamic Acid in Developing Chick Bone. *Dev. Biol.* **1978**, *65* (2), 426–434. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(78\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(78)90038-6).
- (136) Zhao, W.; Wang, Z.; Xu, Z.; Sahai, N. Osteocalcin Facilitates Calcium Phosphate Ion Complex Growth as Revealed by Free Energy Calculation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (18), 13047–13056. <https://doi.org/10.1039/C8CP01105B>.
- (137) Rammelt, S.; Neumann, M.; Hanisch, U.; Reinstorf, A.; Pompe, W.; Zwipp, H.; Biewener, A. Osteocalcin Enhances Bone Remodeling around Hydroxyapatite/Collagen Composites. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *73A* (3), 284–294. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30263>.
- (138) Luo, G.; Ducy, P.; McKee, M. D.; Pinero, G. J.; Loyer, E.; Behringer, R. R.; Karsenty, G. Spontaneous Calcification of Arteries and Cartilage in Mice Lacking Matrix GLA Protein. *Nature* **1997**, *386* (6620), 78–81. <https://doi.org/10.1038/386078a0>.
- (139) Carvalho, M. S.; Cabral, J. M. S.; da Silva, C. L.; Vashishth, D. Bone Matrix Non-Collagenous Proteins in Tissue Engineering: Creating New Bone by Mimicking the Extracellular Matrix. *Polymers* **2021**, *13* (7), 1095. <https://doi.org/10.3390/polym13071095>.
- (140) Staines, K. A.; MacRae, V. E.; Farquharson, C. The Importance of the SIBLING Family of Proteins on Skeletal Mineralisation and Bone Remodelling. *J. Endocrinol.* **2012**, *214* (3), 241–255. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0143>.

- (141) Olszta, M. J.; Cheng, X.; Jee, S. S.; Kumar, R.; Kim, Y.-Y.; Kaufman, M. J.; Douglas, E. P.; Gower, L. B. Bone Structure and Formation: A New Perspective. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2007**, *58* (3), 77–116. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>.
- (142) Edelman, I. S.; James, A. H.; Baden, H.; Moore, F. D. ELECTROLYTE COMPOSITION OF BONE AND THE PENETRATION OF RADIOSODIUM AND DEUTERIUM OXIDE INTO DOG AND HUMAN BONE. *J. Clin. Invest.* **1954**, *33* (2), 122–131. <https://doi.org/10.1172/JCI102878>.
- (143) Fernández-Seara, M. A.; Wehrli, S. L.; Wehrli, F. W. Diffusion of Exchangeable Water in Cortical Bone Studied by Nuclear Magnetic Resonance. *Biophys. J.* **2002**, *82* (1), 522–529. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75417-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75417-9).
- (144) Samuel, J.; Sinha, D.; Zhao, J. C.-G.; Wang, X. Water Residing in Small Ultrastructural Spaces Plays a Critical Role in the Mechanical Behavior of Bone. *Bone* **2014**, *59*, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.11.018>.
- (145) Wilson, E. E.; Awonusi, A.; Morris, M. D.; Kohn, D. H.; Tecklenburg, M. M. J.; Beck, L. W. Three Structural Roles for Water in Bone Observed by Solid-State NMR. *Biophys. J.* **2006**, *90* (10), 3722–3731. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.070243>.
- (146) Robison, R. The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification. *Biochem. J.* **1923**, *17* (2), 286–293.
- (147) Fell, H. B.; Robison, R. The Development of the Calcifying Mechanism in Avian Cartilage and Osteoid Tissue. *Biochem. J.* **1934**, *28* (6), 2243–2253.
- (148) Gamble, J. L. Chemical Anatomy, Physiology, and Pathology of Extracellular Fluid. Fifth Edition. *Soil Sci.* **1952**, *74* (5), 403.
- (149) Termine, J. D.; Wuthier, R. E.; Posner, A. S. Amorphous-Crystalline Mineral Changes During Endochondral and Periosteal Bone Formation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1967**, *125* (1), 4–9. <https://doi.org/10.3181/00379727-125-31999>.
- (150) Betts, F.; Posner, A. S. An X-Ray Radial Distribution Study of Amorphous Calcium Phosphate. *Mater. Res. Bull.* **1974**, *9* (3), 353–360. [https://doi.org/10.1016/0025-5408\(74\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0025-5408(74)90087-7).
- (151) Beniash, E.; Metzler, R. A.; Lam, R. S. K.; Gilbert, P. U. P. A. TRANSIENT AMORPHOUS CALCIUM PHOSPHATE IN FORMING ENAMEL. *J. Struct. Biol.* **2009**, *166* (2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.02.001>.
- (152) Termine, J. D.; Posner, A. S. Infrared Analysis of Rat Bone: Age Dependency of Amorphous and Crystalline Mineral Fractions. *Science* **1966**, *153* (3743), 1523–1525. <https://doi.org/10.1126/science.153.3743.1523>.
- (153) Brown, W. E. Crystal Growth of Bone Mineral. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1966**, *44*, 205–220.
- (154) Crane, N. J.; Popescu, V.; Morris, M. D.; Steenhuis, P.; Ignelzi, M. A. Raman Spectroscopic Evidence for Octacalcium Phosphate and Other Transient Mineral Species Deposited during Intramembranous Mineralization. *Bone* **2006**, *39* (3), 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.059>.
- (155) Zhang, Z.-L.; Chen, X.-R.; Bian, S.; Huang, J.; Zhang, T.-L.; Wang, K. Identification of Dicalcium Phosphate Dihydrate Deposited during Osteoblast Mineralization in Vitro. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *131*, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.11.006>.
- (156) Glimcher, M. J.; Bonar, L. C.; Grynepas, M. D.; Landis, W. J.; Roufosse, A. H. Recent Studies of Bone Mineral: Is the Amorphous Calcium Phosphate Theory Valid? *J. Cryst. Growth* **1981**, *53* (1), 100–119. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(81\)90058-0](https://doi.org/10.1016/0022-0248(81)90058-0).

- (157) Farlay, D.; Panczer, G.; Rey, C.; Delmas, P. D.; Boivin, G. Mineral Maturity and Crystallinity Index Are Distinct Characteristics of Bone Mineral. *J. Bone Miner. Metab.* **2010**, *28* (4), 433–445. <https://doi.org/10.1007/s00774-009-0146-7>.
- (158) Vandecandelaere, N.; Rey, C.; Drouet, C. Biomimetic Apatite-Based Biomaterials: On the Critical Impact of Synthesis and Post-Synthesis Parameters. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23* (11), 2593–2606. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4719-y>.
- (159) De Rooij, J. F.; Heughebaert, J. C.; Nancollas, G. H. A Ph Study of Calcium Phosphate Seeded Precipitation. *J. Colloid Interface Sci.* **1984**, *100* (2), 350–358. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(84\)90440-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(84)90440-5).
- (160) Nassif, N.; Martineau, F.; Syzgantseva, O.; Gobeaux, F.; Willinger, M.; Coradin, T.; Cassaignon, S.; Azaïs, T.; Giraud-Guille, M. M. In Vivo Inspired Conditions to Synthesize Biomimetic Hydroxyapatite. *Chem. Mater.* **2010**, *22* (12), 3653–3663. <https://doi.org/10.1021/cm903596q>.
- (161) Ramírez-Rodríguez, G. B.; Delgado-López, J. M.; Gómez-Morales, J. Evolution of Calcium Phosphate Precipitation in Hanging Drop Vapor Diffusion by in Situ Raman Microspectroscopy. *CrystEngComm* **2013**, *15* (12), 2206–2212. <https://doi.org/10.1039/C2CE26556G>.
- (162) Robin, M.; Euw, S. V.; Renaudin, G.; Gomes, S.; Krafft, J.-M.; Nassif, N.; Azaïs, T.; Costentin, G. Insights into OCP Identification and Quantification in the Context of Apatite Biomineralization. *CrystEngComm* **2020**, *22* (16), 2728–2742. <https://doi.org/10.1039/C9CE01972C>.
- (163) Termine, J. D.; Posner, A. S. Calcium Phosphate Formation in Vitro: I. Factors Affecting Initial Phase Separation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *140* (2), 307–317. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90071-8).
- (164) Termine, J. D.; Peckauskas, R. A.; Posner, A. S. Calcium Phosphate Formation in Vitro: II. Effects of Environment on Amorphous-Crystalline Transformation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *140* (2), 318–325. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90072-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90072-X).
- (165) Christoffersen, J.; Christoffersen, M. R.; Kibalczyk, W.; Andersen, F. A. A Contribution to the Understanding of the Formation of Calcium Phosphates. *J. Cryst. Growth* **1989**, *94* (3), 767–777. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(89\)90102-4](https://doi.org/10.1016/0022-0248(89)90102-4).
- (166) Gómez-Morales, J.; Delgado-López, J. M.; Iafisco, M.; Hernández-Hernández, A.; Prat, M. Amino Acidic Control of Calcium Phosphate Precipitation by Using the Vapor Diffusion Method in Microdroplets. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11* (11), 4802–4809. <https://doi.org/10.1021/cg2004547>.
- (167) Matsumoto, T.; Okazaki, M.; Inoue, M.; Sasaki, J.-I.; Hamada, Y.; Takahashi, J. Role of Acidic Amino Acid for Regulating Hydroxyapatite Crystal Growth. *Dent. Mater. J.* **2006**, *25* (2), 360–364. <https://doi.org/10.4012/dmj.25.360>.
- (168) Tavafoghi, M.; Cerruti, M. The Role of Amino Acids in Hydroxyapatite Mineralization. *J. R. Soc. Interface* **2016**, *13* (123), 20160462. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0462>.
- (169) Thula, T. T.; Svedlund, F.; Rodriguez, D. E.; Podschun, J.; Pendi, L.; Gower, L. B. Mimicking the Nanostructure of Bone: Comparison of Polymeric Process-Directing Agents. *Polymers* **2011**, *3* (1), 10–35. <https://doi.org/10.3390/polym3010010>.
- (170) Qi, Y.; Ye, Z.; Fok, A.; Holmes, B. N.; Espanol, M.; Ginebra, M.-P.; Aparicio, C. Effects of Molecular Weight and Concentration of Poly(Acrylic Acid) on Biomimetic Mineralization of Collagen. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4* (8), 2758–2766. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b00512>.

- (171) Krogstad, D. V.; Wang, D.; Lin-Gibson, S. Polyaspartic Acid Concentration Controls the Rate of Calcium Phosphate Nanorod Formation in High Concentration Systems. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (10), 3106–3113. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00772>.
- (172) Krogstad, D.; Wang, D.; Lin-Gibson, S. Kinetics of Aggregation and Crystallization of Polyaspartic Acid Stabilized Calcium Phosphate Particles at High Concentrations. *Biomacromolecules* **2015**, *16*. <https://doi.org/10.1021/bm501725t>.
- (173) Dey, A.; Bomans, P. H. H.; Müller, F. A.; Will, J.; Frederik, P. M.; With, G. de; Sommerdijk, N. A. J. M. The Role of Prenucleation Clusters in Surface-Induced Calcium Phosphate Crystallization. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (12), 1010–1014. <https://doi.org/10.1038/nmat2900>.
- (174) Mancardi, G.; Terranova, U.; de Leeuw, N. H. Calcium Phosphate Prenucleation Complexes in Water by Means of Ab Initio Molecular Dynamics Simulations. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16* (6), 3353–3358. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00327>.
- (175) Garcia, N. A.; Malini, R. I.; Freeman, C. L.; Demichelis, R.; Raiteri, P.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Harding, J. H.; Gale, J. D. Simulation of Calcium Phosphate Prenucleation Clusters in Aqueous Solution: Association beyond Ion Pairing. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19* (11), 6422–6430. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00889>.
- (176) Wang, L.; Li, S.; Ruiz-Agudo, E.; Putnis, C. V.; Putnis, A. Posner's Cluster Revisited: Direct Imaging of Nucleation and Growth of Nanoscale Calcium Phosphate Clusters at the Calcite-Water Interface. *CrystEngComm* **2012**, *14* (19), 6252–6256. <https://doi.org/10.1039/C2CE25669J>.
- (177) Du, L.-W.; Bian, S.; Gou, B.-D.; Jiang, Y.; Huang, J.; Gao, Y.-X.; Zhao, Y.-D.; Wen, W.; Zhang, T.-L.; Wang, K. Structure of Clusters and Formation of Amorphous Calcium Phosphate and Hydroxyapatite: From the Perspective of Coordination Chemistry. *Cryst. Growth Des.* **2013**, *13* (7), 3103–3109. <https://doi.org/10.1021/cg400498j>.
- (178) Mancardi, G.; Tamargo, C. E. H.; Tommaso, D. D.; Leeuw, N. H. de. Detection of Posner's Clusters during Calcium Phosphate Nucleation: A Molecular Dynamics Study. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (35), 7274–7284. <https://doi.org/10.1039/C7TB01199G>.
- (179) Zhang, Q.; Jiang, Y.; Gou, B. D.; Huang, J.; Gao, Y. X.; Zhao, J. T.; Zheng, L.; Zhao, Y. D.; Zhang, T. L.; Wang, K.; 高愈希; 赵甲亭; 郑雷; 赵屹东. In Situ Detection of Calcium Phosphate Clusters in Solution and Wet Amorphous Phase by Synchrotron X-ray Absorption Near-Edge Spectroscopy at Calcium K-Edge. *IHEP OpenIR* **2015**, *15* (5). <https://doi.org/10.1021/cg5018505>.
- (180) Lin, T.-J.; Chiu, C.-C. Structures and Infrared Spectra of Calcium Phosphate Clusters by Ab Initio Methods with Implicit Solvation Models. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* **2017**, *20* (1), 345–356. <https://doi.org/10.1039/c7cp05975b>.
- (181) Ruiz-Agudo, E.; Ruiz-Agudo, C.; Di Lorenzo, F.; Alvarez-Lloret, P.; Ibañez-Velasco, A.; Rodríguez-Navarro, C. Citrate Stabilizes Hydroxylapatite Precursors: Implications for Bone Mineralization. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7* (6), 2346–2357. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00196>.
- (182) Ibsen, C. J. S.; Gebauer, D.; Birkedal, H. Osteopontin Stabilizes Metastable States Prior to Nucleation during Apatite Formation. *Chem. Mater.* **2016**, *28* (23), 8550–8555. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b01088>.

Chapitre II : La résonance magnétique nucléaire

CHAPITRE II : LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	77
I. GENERALITES.....	81
1) L'effet Zeeman.....	81
2) Le déplacement chimique	85
3) La relaxation	86
4) Sensibilité et rapport signal-sur-bruit.....	89
5) Avantages et inconvénients de la technique.....	90
II. LA RMN EN SOLUTION.....	91
1) Le mouvement brownien	91
2) Le couplage scalaire J	92
3) La quantitatativité en RMN	94
4) Les phénomènes d'échanges chimiques	98
III. LA RMN A L'ETAT SOLIDE	99
1) Rotation à l'angle magique.....	100
2) Anisotropie de déplacement chimique	100
3) Interaction dipolaire.....	104
4) Séquences d'impulsion utilisées.....	106
a) Acquisition directe et découplage hétéronucléaire	106
b) Polarisation croisée CP	107
c) Hetcor et découplage homonucléaire.....	108
d) Recouplage homonucléaire basé sur la diffusion de spins (DARR).....	109
e) Recouplage homonucléaire basé sur la symétrie.....	111
f) Double CP et CP aller-retour	113
g) Recouplage hétéronucléaire (REDOR).....	114
5) Interaction quadripolaire	115
IV. LA RMN HYPERPOLARISEE PAR DNP.....	120
V. CONCLUSION	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125

I. Généralités

La RMN est une méthode spectroscopique permettant de sonder les environnements locaux dans la matière condensée, qu'elle soit sous forme liquide ou solide. La RMN se base sur la mesure du magnétisme nucléaire, premièrement observé sur du LiCl par jets atomiques par Rabi *et al.* en 1936¹. Cette découverte lui vaudra le prix Nobel de physique en 1944. Bloch et Purcell réalisèrent ensuite indépendamment les premières expériences de RMN par induction magnétique sur de la matière condensée, respectivement à l'état liquide² et solide³. Ces travaux, à la base des expériences RMN actuelles, leur permettront d'obtenir conjointement le prix Nobel de physique en 1952.

Dans les paragraphes suivants, nous décrivons les concepts importants quant à la compréhension d'une expérience RMN, ainsi que les séquences clefs que l'on retrouvera dans ce manuscrit. Les concepts avancés sont bien décrits dans les ouvrages de Keeler⁴, de Canet *et al.*⁵, de Levitt⁶ et de Abragam⁷.

1) L'effet Zeeman

Cette spectroscopie exploite les propriétés des spins, propriétés intrinsèques à certaines particules tels que les noyaux, les électrons, les neutrons ou encore les photons. Le spin peut être caractérisé par un moment angulaire \vec{I} qui serait analogue au moment de la rotation d'une particule de dimension nulle. Dans le cas des spins nucléaires, le nombre de spins I dépend du nombre de protons et de neutrons présents dans le noyau. Ainsi, les isotopes d'un même élément n'auront pas nécessairement le même spin nucléaire. Seuls les spins non nuls sont observables par RMN. La charge du noyau en rotation génère un champ magnétique pouvant être associé à un moment magnétique $\vec{\mu}$, colinéaire au moment angulaire de spins \vec{I} via le rapport gyromagnétique γ . Ce dernier est intrinsèque au noyau étudié et peut être positif (spins \vec{I} et $\vec{\mu}$ parallèles) ou négatif (spins \vec{I} et $\vec{\mu}$ antiparallèles).

D'après la mécanique quantique, un nombre de spin I peut adopter $m = 2I+1$ états d'énergie sous l'application d'un champ magnétique extérieur. En l'absence d'un champ magnétique, ces états ont la même énergie et sont qualifiés de dégénérés. En présence d'un champ magnétique extérieur B_0 , le moment magnétique $\vec{\mu}$ suit un mouvement de précession s'effectuant à une vitesse angulaire caractérisée par la pulsation ω_0 (Figure 1A) telle que :

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \quad (1)$$

De plus, sous l'application d'un champ magnétique intense, les $2I+1$ états magnétiques d'énergie $E = -m\hbar\gamma B_0$ vont subir une levée de dégénérescence espaçant ces états d'une quantité d'énergie régulière $\Delta E = \hbar\gamma B_0$. Cet effet s'appelle l'effet Zeeman. Un schéma de la levée de dégénérescence est montré en Figure 1B. La transition d'un état à l'autre suit les règles de la mécanique quantique et ne peut être obtenue qu'à une fréquence particulière telle que $\Delta E = h\nu_0$. Un rapide calcul permet de déterminer que :

$$\nu_0 = \frac{|\gamma|B_0}{2\pi} \quad (2)$$

Cette fréquence ν_0 est appelée fréquence de Larmor ou fréquence de résonance. Celle-ci est directement proportionnelle au rapport gyromagnétique du noyau étudié, ainsi qu'au champ magnétique B_0 . Par exemple, la fréquence de Larmor du proton sera comprise entre 300 MHz et 1 GHz en utilisant des champs magnétiques externes B_0 typiquement compris entre de 7,05 T et 19,5 T.

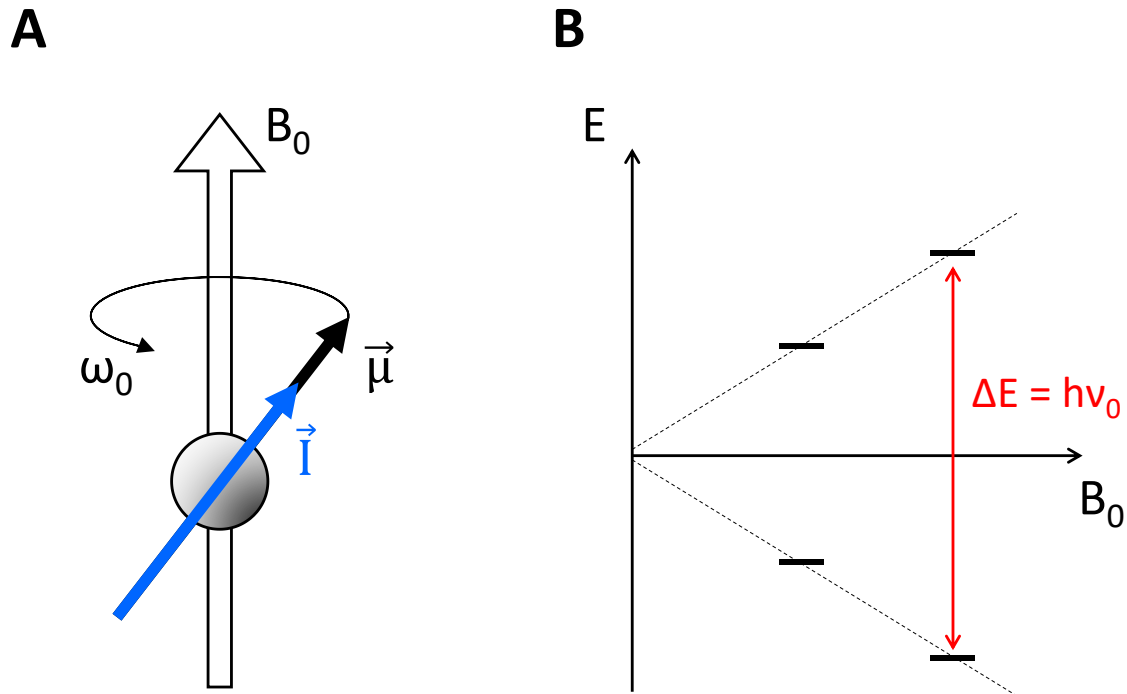


Figure 1 : (A) Représentation d'un spin en présence d'un champ magnétique B_0 . (B) Illustration de la levée de dégénérescence des niveaux d'énergie de spin I ou effet Zeeman (pour un spin $I = \frac{1}{2}$).

En pratique, l'expérience RMN consiste à irradier l'échantillon avec une impulsion radiofréquence (RF) correspondant à la fréquence de Larmor. Cela induit des transitions magnétiques créant 2 populations de spins avec des énergies différentes, dans le cas d'un spin $\frac{1}{2}$. Cela a pour conséquence de créer une aimantation macroscopique \vec{M} des vecteurs $\vec{\mu}$ perpendiculaire au champ \vec{B}_0 . A la suite de cette impulsion, l'aimantation et les populations reviennent à l'équilibre en suivant un phénomène dit « de relaxation ». Ce retour à l'équilibre s'accompagne de l'émission d'une onde électromagnétique détectée par une bobine sous la forme d'un signal temporel s'appelant le FID (Free Induction Decay). Un schéma illustrant la relaxation de l'aimantation est présenté en Figure 2. A l'équilibre, le vecteur aimantation \vec{M} est parallèle au champ magnétique \vec{B}_0 et à l'axe z , et est perpendiculaire au plan xy . Après une impulsion à la fréquence de Larmor, usuellement appelée pulse 90° ou $\frac{\pi}{2}$, le vecteur aimantation \vec{M} est basculé dans le plan xy , perpendiculairement à l'axe z . Après cette impulsion, le vecteur aimantation tend à retourner à l'équilibre en suivant un mouvement de précession. En particulier, on dénombre 2 temps de relaxation permettant d'explicitier ce phénomène :

- Le temps de relaxation longitudinal ou spin-réseau T_1 correspondant au temps nécessaire au retour de la magnétisation à sa position initiale selon l'axe z parallèle à \vec{B}_0 .
- Le temps de relaxation transversal ou spin-spin T_2 correspondant à la perte de cohérence entre les spins nucléaires dans le plan de mesure xy perpendiculaire à \vec{B}_0 .

Ainsi, l'expérience RMN est fortement dépendante du retour à l'équilibre de l'aimantation, ou de la différence des populations de spins d'énergie différentes. Les populations des niveaux d'énergie suivent une distribution de Boltzmann proportionnelle à $e^{-\frac{m\gamma\hbar B_0}{kT}}$, où k est la constante de Boltzmann ($1,380\ 649 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$). Il s'avère que cette différence de population est très faible à température ambiante ce qui implique une faible sensibilité dans les expériences RMN.

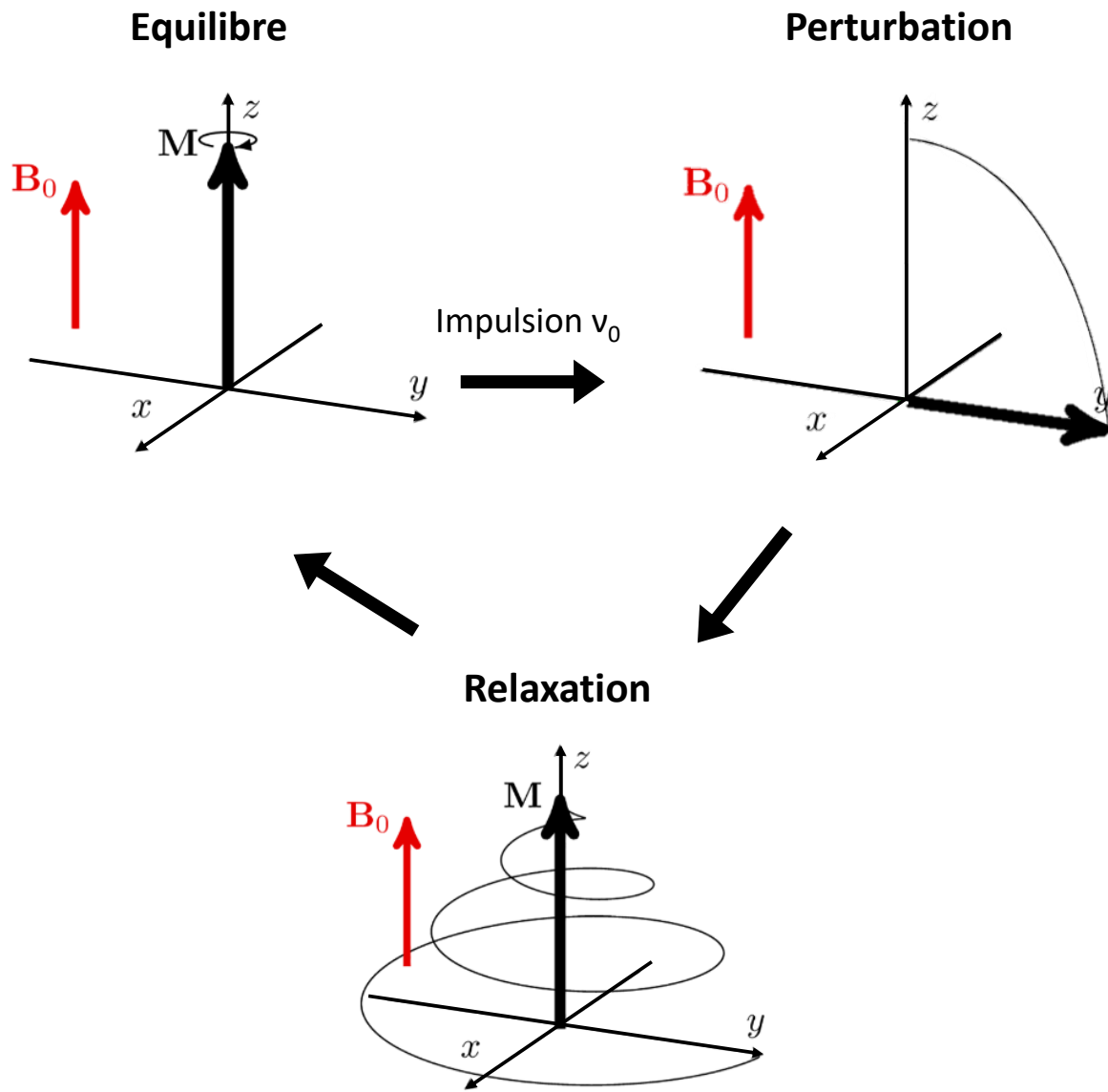


Figure 2 : Représentation schématique de la relaxation. A l'équilibre, les spins présentent une magnétisation \vec{M} parallèle à l'axe z. Suite à une impulsion 90° , le vecteur aimantation est basculé dans le plan xy, après quoi il tend à revenir à sa position d'équilibre en suivant un mouvement de précession. Image reproduite d'après Puiseux *et al.*⁸.

L'interprétation d'un spectre est en réalité la lecture de la perturbation à l'effet Zeeman. Cette dernière dépend de différentes interactions pouvant toucher les spins parmi lesquelles figurent :

- Le déplacement chimique
- La relaxation
- L'interaction de couplage scalaire J

- L'anisotropie de déplacement chimique
- L'interaction dipolaire
- L'interaction quadripolaire

Ces interactions peuvent être exprimées en utilisant des notations tensorielles et en manipulant des opérateurs de type Hamiltoniens. Nous pouvons classifier ces interactions comme présenté en Figure 3. Dans cette figure, nous observons un système composé de 2 spins i et j en interaction avec un champ magnétique B_0 . Chaque double flèche représente une interaction.

- La flèche 1 représente les interactions externes touchant l'effet Zeeman par le biais d'une impulsion à la résonance.
- Les flèches 2 et 3 représentent les interactions internes au système de spins. L'interaction entre les 2 spins est appelée l'interaction dipolaire.
 - La flèche 3 regroupe les interactions scalaires de type J et quadripolaires.
 - Enfin, les flèches 4 et 5 décrivent respectivement les phénomènes de relaxation nucléaires et électroniques.

Les ordres de grandeur des principales interactions sont exprimés en Hz dans le *Tableau 1* ci-dessous.

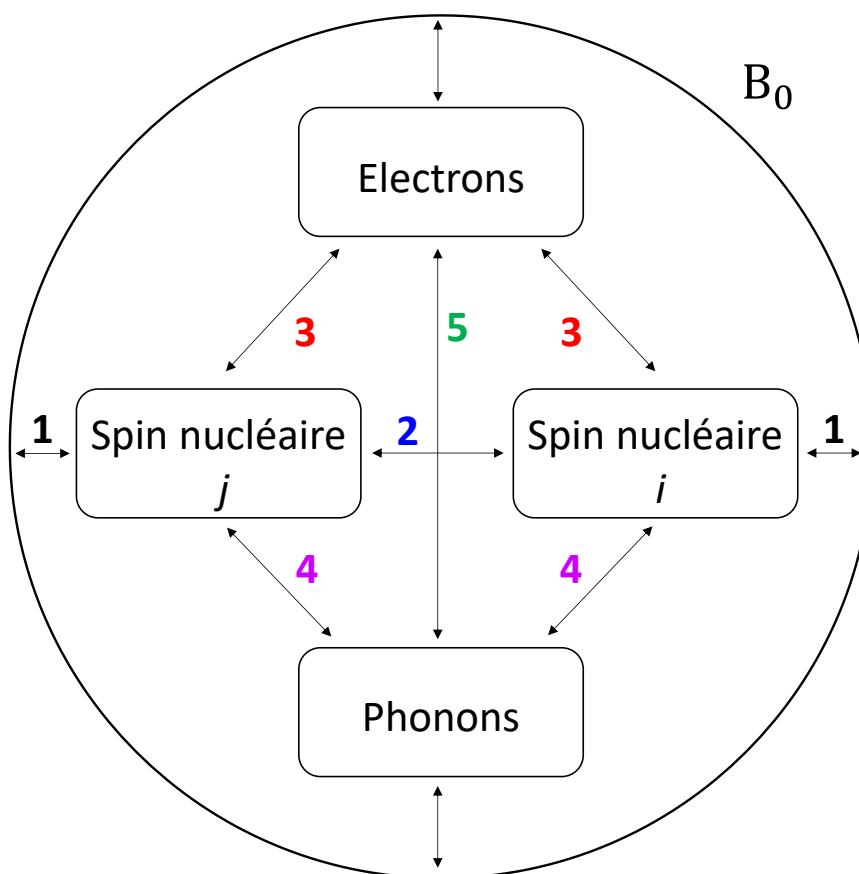


Figure 3 : Représentation schématique des différentes interactions pouvant intervenir dans un système de spins en présence d'un champ magnétique B_0 . Image reproduite d'après Mehring⁹.

Zeeman	Quadripolaire	Dipolaire	CSA	Scalaire J
$\approx 10^8 - 10^9$	$\approx 10^5 - 10^8$	$\approx 10^3 - 10^4$	$\approx 10^3 - 10^4$	$\approx 10^0 - 10^2$

Tableau 1. Ordres de grandeur, en Hz, des différentes interactions observables en RMN.

Dans cette première partie, nous allons détailler les propriétés liées aux phénomènes de déplacement chimique et de relaxation, caractéristiques communes à toute expérience de RMN. Les autres interactions seront décrites plus en profondeur dans les parties suivantes, car certaines de ces interactions ne sont observées qu'à l'état liquide ou à l'état solide.

2) Le déplacement chimique

Après l'acquisition du FID qui représente un signal temporel, il est possible de revenir à un signal fréquentiel en appliquant une transformée de Fourier au FID. On obtient alors un spectre lisible dont les raies, caractéristiques de l'échantillon, ont des fréquences caractéristiques de l'environnement chimique de l'échantillon. La position d'un signal est appelée le « déplacement chimique δ » et est généralement exprimée en ppm (partie par millions) selon l'opération $\delta = 10^6 \frac{\nu_{\text{ech}} - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}}$, où ν_{ech} et ν_{ref} sont les fréquences de l'échantillon et d'une référence. La référence correspond généralement à un composé de référence pour un noyau donné. Notons que le concept de déplacement chimique ne dépend pas du champ magnétique B_0 . Un composé aura le même déplacement chimique qu'il soit étudié avec un spectromètre opérant à une fréquence de Larmor de 300 MHz ou de 1 GHz, par exemple.

Le déplacement chimique contient des informations sur l'environnement chimique du noyau étudié et peut par conséquent refléter plusieurs informations d'intérêt telles que :

- La nature des liaisons chimiques
- La longueur des liaisons chimiques
- Les fonctions chimiques portées par l'échantillon analysé
- Les échanges chimiques lors de phénomène de complexation, par exemple

Lorsque le spin interagit avec un champ externe B_0 , il interagit par la même occasion avec les électrons à proximité formant ainsi un phénomène d'écrantage du champ magnétique perçu par le spin selon la relation $B' = B_0(1 - \sigma)$, où B' est le champ magnétique perçu par le spin et σ la constante d'écrantage. Cela induit alors que la fréquence de résonance propre à l'échantillon est modifiée. Dans le cas d'un liquide isotrope, on obtient alors la relation $\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} (1 + \delta_{\text{iso}})$ où δ_{iso} est le déplacement chimique isotrope. Dans le cas d'un milieu anisotrope, typiquement un solide, l'isotropie du déplacement chimique n'est plus assurée et il en résulte plusieurs déplacements chimiques se traduisant par un fort élargissement des raies. Ce cas sera développé plus loin.

La circulation du cortège électronique influençant le déplacement chimique peut être pauvre ou riche. Il en résulte que les environnements riches en électron auront des déplacements chimiques faibles, et inversement, les environnements pauvres en électron auront des déplacements chimiques élevés. La première interprétation qui en découle s'applique à la RMN ^1H et la RMN ^{13}C , spectroscopies très utilisées dans le cadre de la chimie organique ou de la RMN des protéines, où il est fait pléthores de tables de déplacements chimiques permettant d'appréhender la fonction chimique d'un composé.

Si ces concepts ne seront pas nécessairement exploités dans le cadre de ce manuscrit, nous souhaitons préciser que le concept de déplacement chimique, qui caractérise la position d'un signal, est une propriété quasiment unique à chaque composé et permet l'identification de phases d'intérêt.

3) La relaxation

Comme décrit précédemment, les phénomènes de relaxation sont au nombre de 2, la relaxation longitudinale et la relaxation transversale. Ces derniers sont totalement disjoints. Pour les liquides, T_1 et T_2 sont habituellement proches et peuvent varier typiquement entre 100 ms et plusieurs centaines de secondes. Pour les solides, T_2 peut généralement être très court, proche de la dizaine de μ s alors que T_1 peut être très long, pouvant durer jusqu'à plusieurs centaines de secondes. Ces paramètres de relaxation dépendent généralement des mouvements moléculaires. Il est alors possible de déterminer des informations dynamiques correspondants à des mouvements translationnels, rotationnels ou des mouvements d'ensembles des molécules. La relaxation représente à elle seule une branche entière de la spectroscopie qui n'est pas nécessairement exploitée dans le cadre de ce manuscrit, c'est pourquoi nous nous contenterons de décrire les phénomènes de relaxation, leur détermination, et leur interprétation sans rentrer dans les détails.

Le temps de relaxation longitudinale T_1 correspond au retour de l'aimantation à sa position initiale selon l'axe z. Il peut être mesuré de plusieurs manières mais les plus populaires sont les séquences d'impulsion d'inversion-récupération et de saturation-récupération. La séquence d'impulsion de l'inversion-récupération est montrée en Figure 4A. Après une impulsion, l'aimantation est basculée dans le plan xy. La projection de l'aimantation dans le plan xy est la seule permettant de détecter un signal, la projection selon l'axe z ne servant qu'à définir le temps nécessaire au retour à l'équilibre. Il convient de s'affranchir de toute contribution transversale lorsqu'on mesure le T_1 , c'est pourquoi on procède généralement à une inversion complète de l'aimantation par rapport à son état d'équilibre, au moyen d'une impulsion à 180° (aussi appelée impulsion π). L'aimantation se trouve alors selon l'axe z uniquement. On laisse ensuite le système relaxer pendant une durée définie, appelée période d'évolution, après laquelle on envoie une impulsion à 90° de manière à convertir l'aimantation longitudinale en aimantation transversale détectable par la bobine. Dans l'objectif de déterminer le T_1 , la période d'évolution τ est variée et les composantes longitudinales M_z correspondantes sont enregistrées. D'après les équations de Bloch, on a alors :

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_z - M_0}{T_1}, \quad (3)$$

où M_0 représente l'aimantation nucléaire à l'équilibre. Cette équation différentielle a pour solution l'équation $M_z(\tau) = M_0 + (M_z(0) - M_0)e^{\left(\frac{-\tau}{T_1}\right)}$, où $M_z(0)$ est l'aimantation longitudinale obtenue pour $\tau = 0$. Dans le cas idéal d'une impulsion 180° parfaite, on a $M_z(0) = -M_0$, ce qui revient à résoudre l'équation suivante :

$$\ln \left[\frac{M_0 - M_z(\tau)}{2M_0} \right] = -\frac{\tau}{T_1} \quad (4)$$

Les valeurs de $M_z(\tau)$ sont alors reportées en fonction de τ (Figure 4B) et la valeur de T_1 est lue comme l'inverse de la pente de l'équation (4) (Figure 4C).

Le temps de relaxation longitudinal T_1 correspond à un retour de 63% de l'aimantation longitudinale après une impulsion à 90° . En pratique, T_1 représente une durée entre laquelle il faut espacer l'enregistrement de chaque spectre. Si on souhaite se placer dans des conditions quantitatives, il convient d'imposer un délai de $5 \times T_1$ entre chaque pulse permettant de retrouver environ 99% de l'aimantation longitudinale. Dans certains cas où la quantitativité n'est pas recherchée, mais plutôt l'obtention d'un maximum de signal en un temps réduit, il peut être intéressant d'espacer les pulses d'une durée de $1,3 \times T_1$, durée optimale permettant d'obtenir le meilleur rapport signal-sur-bruit (SNR) en un minimum de temps¹⁰.

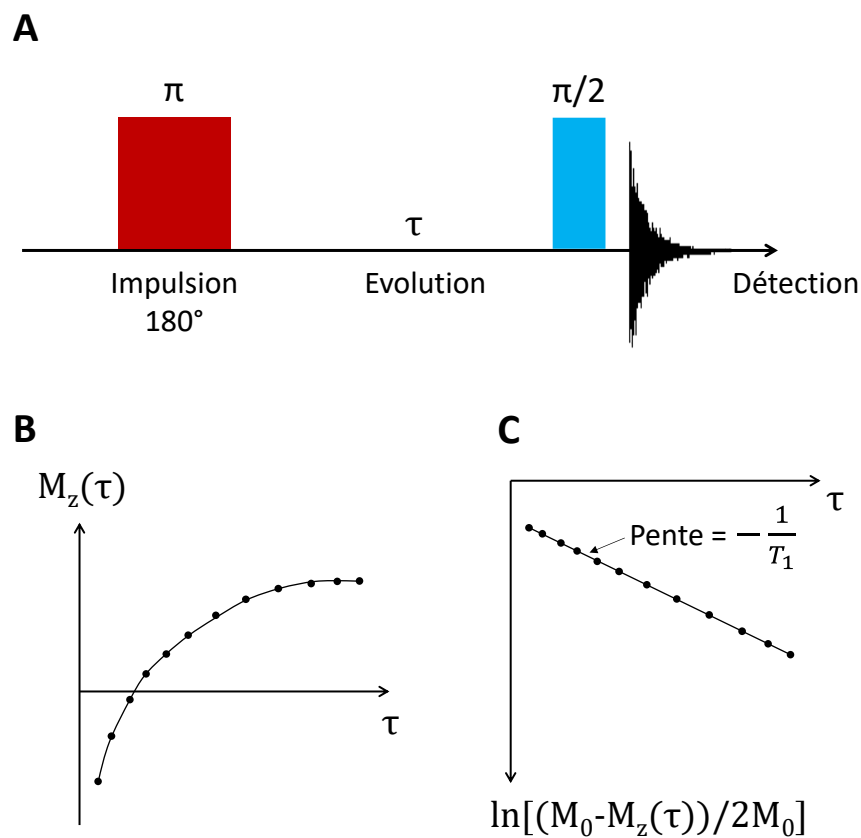


Figure 4 : (A) Séquence d'impulsion d'inversion-récupération permettant la mesure du temps de relaxation longitudinale T_1 . (B) Aimantation longitudinale en fonction du délai d'évolution τ . (C) Traitement mathématique permettant d'extraire la valeur de T_1 .

Si on s'intéresse maintenant au temps de relaxation transversale T_2 , on le définit comme la perte de cohérence dans le plan xy après une impulsion à 90° . T_2 est toujours inférieur ou égal à T_1 . T_2 est sensible à la perte de cohérence des spins provoquée par des phénomènes inter-spins, d'où son nom temps de relaxation spin-spin. Ces interactions provoquent des hétérogénéités de champ et donc de fréquences de Larmor. Le T_2 est lié à la longueur du signal temporel détecté, le FID, et est donc lié à la largeur des signaux. En théorie, la largeur à mi-hauteur d'un signal est inversement proportionnelle à T_2 . Cependant, en pratique, le retour à l'équilibre de l'aimantation transversale détecté T_2^* comprend une contribution additionnelle provenant des inhomogénéités du champ de B_0 s'ajoutant à T_2 telle

que : $\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'}$, où $\frac{1}{T_2'}$ contient les effets de l'inhomogénéité du champ B_0 . Il ne suffit pas de mesurer la largeur à mi-hauteur d'un signal pour déterminer T_2 car il faut s'affranchir de ces effets de T_2' . Sans rentrer dans les détails, la mesure de T_2 se fait généralement avec une séquence de type CPMG contenant des trains d'échos destinés à supprimer les inhomogénéités de champ B_0 .

Les sources de relaxation sont nombreuses. Globalement, chaque paramètre influençant la relaxation longitudinale influencera la relaxation transversale. Au même titre qu'un champ radiofréquence opérant à la fréquence de Larmor volontairement émis à l'extérieur de l'échantillon, nous pouvons imaginer des champs locaux aléatoires au sein même de l'échantillon pouvant induire des transitions non souhaitées. Ces champs aléatoires représentent la première source de relaxation et dépendent du solvant (si solvant il y a) et de la température. De manière générale, chaque interaction couplée au spin pourra engendrer des sources de relaxation. Cela peut s'opérer via le couplage scalaire J , les interactions dipolaires et quadripolaires, l'anisotropie de déplacement chimique ou la présence de centres paramagnétiques dans l'échantillon. Les sources de relaxation décrites à l'instant sont directes, mais 2 interactions différentes peuvent avoir un effet cumulatif menant à un mécanisme de relaxation croisé. Si nous ne rentrons pas dans les détails ici, il convient de préciser que ces sources de relaxation peuvent être très embêtantes pour l'acquisition de données. Par exemple, un T_1 très long se traduira par un temps nécessaire à l'acquisition d'un spectre très long. Par ailleurs, un T_2 très court mènera à l'acquisition d'un spectre très large, parfois trop large pour être détecté. Par ailleurs, l'utilisation de séquences d'impulsion complexes permettant d'obtenir des informations structurales détaillées sera compromise dans le cas de systèmes relaxant trop rapidement.

Néanmoins, la versatilité des paramètres influençant la relaxation peut aussi permettre d'obtenir des informations dynamiques d'ordre moléculaire. L'étude consiste à exprimer une vitesse de relaxation comme une combinaison linéaire de densités spectrales $J(\omega)$, telle que : $J(\omega) = \frac{2\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2}$, avec $\omega = 2\pi\nu$ la pulsation, ν une fréquence de résonance et τ_c est un temps de corrélation lié aux propriétés dynamiques du système. La relaxation longitudinale T_1 est proportionnelle à $J(\omega)$ et est donc minimale à $\tau_c = \frac{1}{\omega_0}$. D'autre part, la relaxation transversale T_2 est proportionnelle à $J(\omega) + J(0)$ et sera donc proportionnelle au temps de corrélation τ_c . La conclusion que l'on peut en tirer est illustrée en Figure 5. La mesure des temps de relaxation permet ainsi de différencier qualitativement 3 cas extrêmes :

- Les temps de relaxation T_1 et T_2 sont similaires et élevés : le système est liquide et/ou composé de petites molécules ;
- Le temps de relaxation T_1 est supérieur à T_2 mais le système est soluble : le signal correspond à une molécule soluble rigide de type « polymère » ou « protéines » ;
- Le temps de relaxation T_1 est bien supérieur à T_2 : le système est solide.

Ces données qualitatives peuvent être très intéressantes, mais des modèles permettant d'obtenir plus de précisions sur les mouvements moléculaires existent. Ils sont globalement compris dans la branche d'étude de la relaxométrie consistant à mesurer des vitesses de relaxation à différents champs magnétiques. Nous n'avons pas procédé à de telles analyses dans le cadre de ce travail de thèse, c'est pourquoi ces modèles ne seront pas décrits.

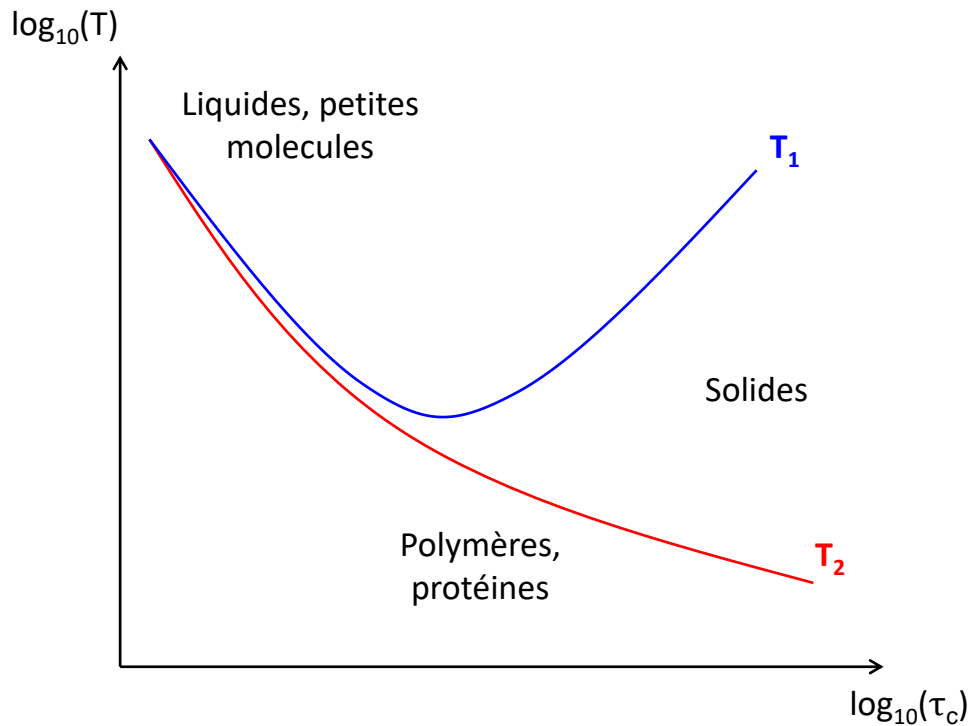


Figure 5 : Evolution des temps de relaxation longitudinale et transversale en fonction du temps de corrélation τ_c . On remarque que T_1 passe par un minimum alors que T_2 décroît à mesure que le temps de corrélation augmente.

4) Sensibilité et rapport signal-sur-bruit

Le concept de sensibilité traduit la capacité de distinguer spectralement de faibles différences de concentration. Il s'agit d'un inconvénient de taille dans les expériences RMN, en comparaison à d'autres techniques, car la sensibilité provient du faible écart de population polarisés à température ambiante. La sensibilité intrinsèque d'un noyau dépend de son rapport gyromagnétique γ , de son abondance naturelle, ainsi que de son anisotropie et de son nombre de spins (si supérieur à $\frac{1}{2}$), qui élargissent les signaux et nécessairement diminuent leur intensité.

On définit le concept de rapport signal-sur-bruit SNR tel que le rapport de l'intensité du signal détecté sur l'écart type du bruit :

$$\text{SNR} = \frac{I_{\text{signal}}}{\sigma_{\text{bruit}}} \propto N |\gamma|^2 B_0^2 \propto t^{\frac{1}{2}}$$

Notons la dépendance du SNR avec le nombre de particules par unité de volume N (assimilable à une concentration), au rapport gyromagnétique γ et au champ magnétique B_0 . Le SNR peut être simplement amélioré en augmentant le nombre de scans, ce qui revient à augmenter le temps expérimental t . Il découle de cette relation qu'un SNR sera 2 fois plus élevé si le temps expérimental est quadruplé ou si la concentration est doublée. On en déduit alors qu'à SNR égal, on a $N \propto t^{\frac{1}{2}}$, c'est-à-dire que si on double la concentration de l'échantillon, on aura le même SNR en 4 fois moins de

Le 2^{ème} point faible de la RMN réside dans sa faible sensibilité provenant du faible écart de populations polarisées ou non responsables du vecteur aimantation, comme discuté précédemment. Si certains noyaux ont une sensibilité intrinsèque élevée rendant leur étude aisée et systématique, tels que le ¹H, le ³¹P ou ¹⁹F, c'est loin d'être le cas pour tous les noyaux. En particulier, le ¹⁷O est un isotope de l'oxygène très peu abondant et son étude systématique permettrait de caractériser en profondeur beaucoup de molécules ayant un intérêt biologique. Un autre exemple concerne le ⁴³Ca qui a son importance dans le cadre de ce manuscrit.

Fort heureusement, beaucoup d'efforts sont dédiés à l'amélioration de la sensibilité en RMN. Pour cela, plusieurs stratégies peuvent être adoptées, telles que :

- L'augmentation de la quantité d'échantillons (sondes plus grosses) permettant inévitablement d'augmenter la quantité de spins
- L'enrichissement isotopique de manière à augmenter la quantité de spins dans le cas d'une abondance naturelle inférieure à 100%
- L'utilisation de séquences d'impulsions spécifiques basées sur des transferts de population
- La diminution de la température permettant d'augmenter les écarts de populations de spins
- L'augmentation du champ magnétique B₀
- Les stratégies de RMN hyperpolarisées existant à l'état liquide ou solide
- Facteur de remplissage des rotors pour la RMN à l'état solide
- Le découplage des interactions anisotropes permettant de réduire la largeur des signaux
- L'utilisation d'instrumentation poussée (cryosondes, microbobines, réduction du bruit des préamplificateur...)

Certaines de ces stratégies seront utilisées dans le cadre de ce travail doctoral, et si jugé nécessaire, seront détaillées dans ce manuscrit.

II. La RMN en solution

La RMN en solution représente une méthode d'analyse de choix pour l'étude de systèmes biologiques, par exemple pour étudier la structure et la dynamique de protéines. Néanmoins, son champ d'application ne s'arrête pas là car tous les noyaux décrits précédemment sont observables, si tant est que l'échantillon est soluble. En effet, dans cette spectroscopie, seules les molécules solubles sont détectables. Ainsi, l'étude d'ions, de molécules organiques d'intérêt pharmaceutique ou l'étude de phénomènes de complexation représentent des applications directes de la RMN en solution.

1) Le mouvement brownien

La spécificité de la RMN en solution provient du mouvement brownien qui a lieu dans les liquides. Le mouvement brownien est défini comme un mouvement spontané, erratique et permanent de chaque molécule contenue dans un fluide. Ce phénomène est basé sur la diffusion des particules et dépend donc directement de la température, de la viscosité du milieu et de la taille des particules. Ainsi, une particule dans un fluide aura tendance à se déplacer de manière aléatoire après un temps t d'une distance quadratique moyenne $\langle X^2(t) \rangle = 2dDt$, où d est la dimension du mouvement (linéaire,

plan, tridimensionnel) et D est le coefficient de diffusion. D est défini par la loi de Stokes-Einstein tel que $D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$, où T , η et r sont la température, la viscosité du milieu et la taille de la particule. Ce mouvement brownien entraîne de la dynamique rotatoire au près des molécules contenues dans le solvant contenu dans le tube RMN. Cela a pour effet de moyenniser toutes les interactions dites anisotropes. Parmi celles-ci figurent l'anisotropie de déplacement chimique et les interactions dipolaires et quadripolaires. Comme nous allons le voir dans la partie suivante, ces interactions anisotropes ont pour effet d'augmenter la largeur des signaux détectés, si bien que les signaux obtenus par RMN en solution sont généralement très fins (largeur à mi-hauteur < 10 Hz dans la majorité des cas).

2) Le couplage scalaire J

Ainsi, les seules interactions à prendre en compte dans le cadre de la RMN en solution sont le déplacement chimique, la relaxation et les couplages scalaires J . Ces derniers sont observés lorsque des noyaux actifs sont reliés par des liaisons chimiques. Si l'on considère 2 spins voisins excités après une impulsion 90° , l'effet du déplacement chimique va induire des champs magnétiques locaux autour de ces spins. S'ils sont suffisamment proches, ces 2 aimants vont interagir et subir l'influence de l'autre spin. On dit alors que ces spins sont couplés magnétiquement et cela va provoquer un « splitting » (ou une séparation) des signaux. Cette interaction est réciproque, c'est-à-dire que si un spin i sépare un spin j , alors j sépare i . Le « splitting » peut être exprimé en fonction d'une multiplicité, c'est-à-dire un nombre de signaux, et d'une constante de couplage.

La multiplicité de ce « splitting » va dépendre du nombre de voisins magnétiquement inéquivalents. L'équivalence magnétique est directement reliée aux éléments de symétrie dans la molécule étudiée. Pour un spin $I = \frac{1}{2}$, la règle appliquée à la multiplicité est appelée la règle des $N+1$, car si le signal d'un spin i a N spins voisins magnétiquement inéquivalents, alors le spin i sera splitté en $N+1$ signaux dont les intensités sont imposées par le triangle de Pascal. Ces concepts sont illustrés en Figure 7.

D'autre part, les constantes de couplage définissent un écart régulier en Hz entre chaque signal « splitté ». Elles dépendent de plusieurs facteurs, tels que le nombre de liaisons entre les noyaux inéquivalents, la nature de la liaison (alcane, alcène, alcyne, cycles et tailles de cycles...) et de l'orientation de ces liaisons les unes aux autres (par exemple : cis et trans dans les liaisons vinyliques ou ortho, méta et para dans les cycles aromatiques). Ces constantes de couplage sont généralement comprises entre 0 et 30 Hz pour le couplage scalaire homonucléaire J entre protons.

Nombre de voisins magnétiquement inéquivalents à i	Multiplicité, ou nombre de signaux de i	Intensités relatives des signaux de i
0	1 (singulet)	1
1	2 (doublet)	1 1
2	3 (triplet)	1 2 1
3	4 (quadruplet)	1 3 3 1
4	5 (quintuplet)	1 4 6 4 1
5	6 (sextuplet)	1 5 10 10 5 1

Figure 7 : Illustration de la règle des N+1 sur la multiplicité et l'intensité des signaux d'un massif, cette dernière étant imposée par le triangle de Pascal.

A titre d'exemple, nous montrons ci-dessous le spectre ^1H de l'éthanol en Figure 8. Cette molécule est composée d'un groupement méthyl, d'un groupement méthylène et d'une fonction alcool. Cette dernière possède un proton dit labile qui peut s'échanger avec les molécules du solvant. Il n'est par conséquent pas observé dans ce cas. Parmi les 2 groupements aliphatiques observables, les protons au sein d'une même fonction sont considérés équivalents car les liaisons simples sont mobiles et ont la possibilité d'entrer en rotation. D'autre part, les trois protons du groupement méthyl sont à proximité des 2 protons du groupement méthylène et *vice versa*. Par conséquent, le signal du méthyl est vu comme un triplet, alors que le signal du groupement méthylène apparaît comme un quadruplet d'après la Figure 7. De plus, nous remarquons que l'espacement entre chaque signal d'un même groupement est espacé de 7 Hz, ce qui démontre que ces 2 groupements exercent bien le même couplage scalaire l'un sur l'autre. Dans ce cas, le couplage est un couplage homonucléaire de type ^3J car 3 liaisons séparent les protons d'un groupement à l'autre.

Lorsque l'écart en fréquence entre les spins magnétiquement inéquivalents est faible, l'interprétation des intensités relatives est plus compliquée car des effets de toits sont observés. Dans certains cas peu complexes, il est possible de reconnaître des schémas de systèmes magnétiquement inéquivalents et de pouvoir interpréter les spectres. Dans ce cas, il est d'usage de procéder en utilisant la notation introduite par John Pople¹¹, lauréat du prix Nobel de Chimie en 1998 pour ses travaux sur la mécanique quantique. Il faut aussi savoir que des couplages scalaires hétéronucléaires existent aussi, tel que le couplage $\text{J}(^1\text{H}-^{13}\text{C})$. Ce dernier peut présenter des constantes de couplage légèrement plus élevées de l'ordre de quelques dizaines de Hz à environ 150 Hz. Néanmoins, l'abondance naturelle du ^{13}C est de $\sim 1\%$, ce qui limite la probabilité de trouver expérimentalement de tels couplages.

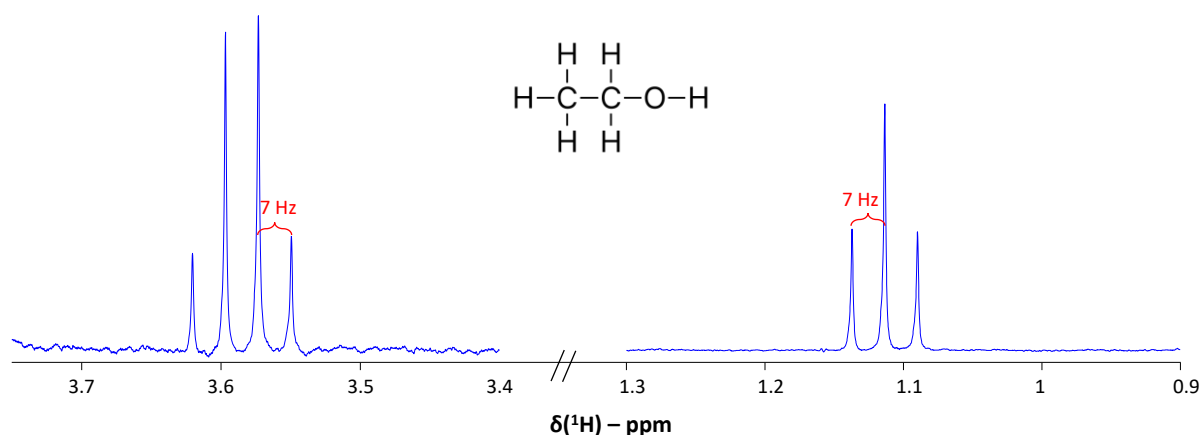


Figure 8 : Spectre RMN ^1H de l'éthanol. La constante de couplage scalaire 3J est indiquée en rouge.

Dans le cadre ce manuscrit, ces couplages J sont observés dans les spectres ^1H de solutions contenant de l'acide aspartique et de l'acide polyaspartique. Dans le cas de la RMN ^{31}P , ^{23}Na ou ^{43}Ca , les ions phosphates, Na^+ et Ca^{2+} ne présentent pas de liaisons directes avec des noyaux magnétiquement inéquivalents, nous observons alors des signaux uniques exemptés de couplages scalaires J .

3) La quantitatité en RMN

Dans le cadre ce travail doctoral, nous avons exploité les propriétés quantitatives de la RMN en solution. Dans ce paragraphe, nous explicitons la méthode et les détails expérimentaux nécessaires à la bonne interprétation des résultats.

Tout d'abord, il faut distinguer 2 types de RMN quantitatives : la détermination de concentration relative et la détermination de concentration absolue. Les 2 méthodes sont basées sur une expérience très simple d'impulsion à 90° suivie d'une intégration des signaux. Il faut toutefois s'assurer de fixer le délai entre les pulses à au moins $5xT_1$, avec T_1 le temps de relaxation longitudinale du signal relaxant le plus lentement¹². Il faut aussi s'assurer d'avoir un SNR le plus élevé possible. La détermination de concentration relative permet de comparer les signaux dans un même échantillon et de déterminer les proportions relatives des différentes espèces en présence dans l'échantillon. Cette méthode ne nécessite pas de calibration.

D'autre part, la détermination de la concentration absolue nécessite une calibration. Cette dernière nécessite d'insérer un composé de référence de concentration connue. Il faut s'assurer que ce composé de référence n'interagisse pas avec les composés d'intérêt contenus dans l'échantillon et que sa résonance soit suffisamment éloignée des signaux de l'échantillon. Le reste de la méthode reste identique.

Avant de détailler plus en détail les choix adaptés à nos conditions expérimentales, nous souhaitons préciser les étapes nécessaires à l'acquisition d'un spectre RMN. Tout d'abord, après l'insertion d'un tube RMN contenant l'échantillon dans le spectromètre, il convient de réaliser les étapes de lock et de shimming. L'étape du lock permet de corriger la dérive du champ magnétique au

cours du temps. La dérive est généralement mesurée sur la résonance du deutérium et provient de changements mineurs du champ magnétique B_0 au cours du temps. La résonance du deutérium est scannée en permanence et une bobine applique un courant électrique de manière à maintenir la position de la résonance à la même position au cours du temps. L'étape du shimming est nécessaire pour maintenir un champ magnétique B_0 homogène autour de l'échantillon. Cette optimisation spatiale utilise des bobines placées stratégiquement autour de l'échantillon. L'optimisation automatique du shimming utilise le signal détecté par le lock de manière à maximiser son intensité.

Ceci étant dit, ces étapes cruciales nécessitent l'introduction d'une certaine proportion de solvant deutéré dans l'échantillon, généralement 10% en volume. Dans notre cas, nous travaillons en solution aqueuse et le contrôle du pH est crucial. Ainsi, de manière à s'affranchir des sources d'erreur sur le pH suite à l'ajout de D_2O dans le tube, nous avons décidé d'introduire systématiquement un capillaire dans le tube RMN. Ce capillaire contenait une masse précise connue de NaH_2PO_4 dissoute dans du D_2O . Ainsi, ce capillaire externe présentait le double avantage de réaliser les étapes de lock et de shimming, ainsi que d'introduire une référence connue permettant d'obtenir une résonance de référence faisant office de calibration pour des expériences quantitatives en RMN ^{31}P . En particulier, nos signaux d'intérêt se situaient entre 1 et 3 ppm, alors que la référence se situant aux alentours de 0 ppm. En utilisant une telle méthodologie, il fallait s'assurer de toujours introduire le même volume d'échantillon, puis introduire le capillaire dans le tube et enfin fermer le tube pour éviter l'éventuelle évaporation de l'échantillon. Des photographies du capillaire seul et du capillaire introduit dans un tube RMN sont montrées en Figure 9.

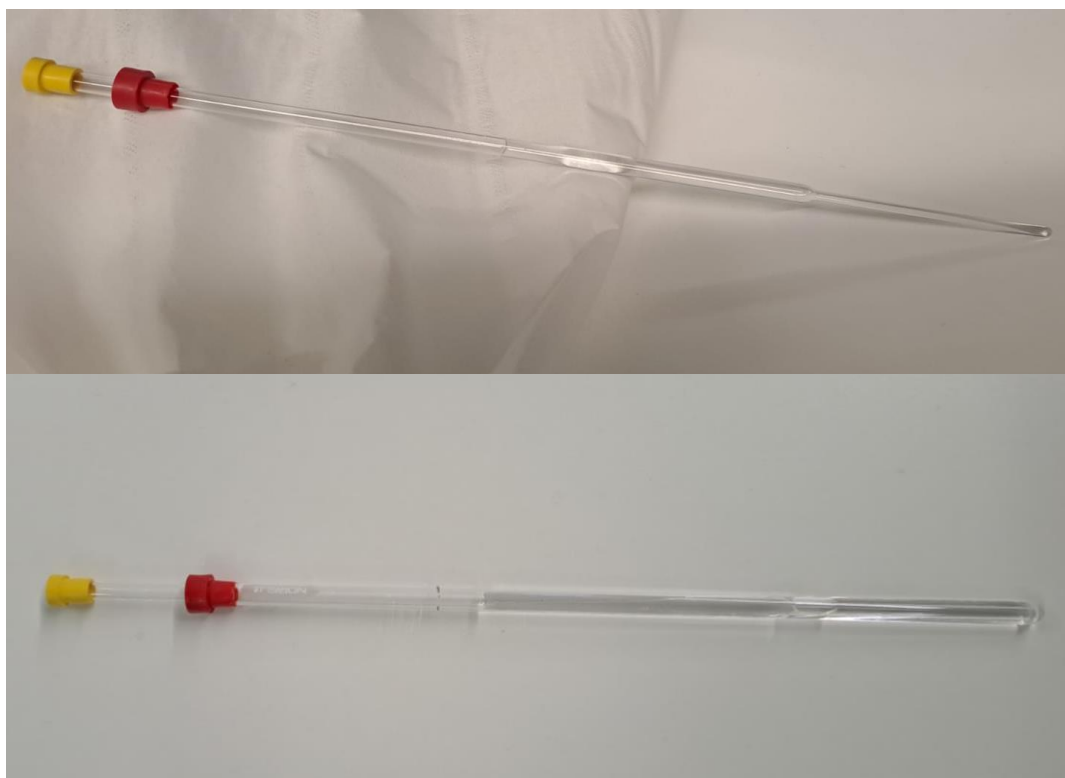


Figure 9 : Photographies du capillaire contenant NaH_2PO_4 dans du D_2O (haut) et inséré dans un tube RMN de 5 mm de diamètre (bas).

Au cours de cette thèse, la RMN quantitative a été largement utilisée pour des études *in-situ*. L'objectif était *in fine* de déterminer la concentration en espèces ioniques au cours de la précipitation

de phosphates de calcium. Comme la RMN en solution ne permet que la détection des espèces solubles, nous observons une baisse de l'intégration du signal dès lors qu'un précipité se formait. Il était alors possible de calculer la concentration en ions liés dans la structure solide formée en négligeant l'existence potentielle d'ions solubles dans un régime d'échange moyen. Ce concept sera explicité dans la prochaine partie.

Les expériences par RMN des noyaux ^1H , ^{23}Na et ^{31}P ont utilisé des séquences d'impulsion simples, *i.e.* simples impulsions à 90° avec un délai de $5 \times T_1$. Cependant, lorsqu'on réalise de telles expériences, il est important d'avoir une bonne résolution temporelle, c'est-à-dire d'enregistrer les spectres successifs avec un intervalle de temps étant le plus court possible, surtout si les réactions sont rapides. Réduire le temps d'acquisition d'un spectre mène inévitablement à un SNR plus faible. Cela revient à augmenter l'incertitude sur la mesure de la concentration au profit d'un plus grand nombre de données.

Dans les paragraphes suivants, nous allons justifier certains choix que nous avons dû prendre dans l'objectif d'avoir le meilleur compromis SNR/temps d'acquisition par spectre. Par exemple, nous avons mesuré le T_1 des ions phosphates dans nos conditions de précipitation à 8s. Cela induit un temps entre les pulses de 40s ce qui peut être insuffisant pour obtenir un bon SNR en un temps réduit lorsqu'on est en présence de faibles concentrations (1–5 mM). Ainsi, nous avons dû faire recourt à l'utilisation d'un pulse de 30° au lieu de 90° . Cette méthode permet d'obtenir le meilleur compromis magnétisation/temps expérimental tout en réduisant la durée nécessaire à la relaxation longitudinale. Si, en théorie, la quantitatité ne peut être obtenue qu'à partir d'une impulsion à 90° , une impulsion à 30° suffit parfois à être quantitatif, sous réserve de choisir un délai entre les impulsions approprié quant à la relaxation de l'échantillon¹³. De plus, la recherche de sensibilité nous a poussé à parfois faire des mesures avec une cryosonde s'accordant au ^{31}P . Ce type de sonde est refroidi avec de l'azote liquide ce qui réduit le bruit électronique. En pratique cela permet d'obtenir jusqu'à 4 fois plus de signal qu'avec une sonde classique¹⁴. En combinant l'utilisation d'un pulse 30° à l'utilisation de cryosondes, nous avons pu obtenir des spectres ^{31}P satisfaisants (SNR > 130) avec une résolution temporelle réduite, pouvant atteindre 5 minutes/spectre pour des concentrations proches des conditions physiologiques (1–5 mM). Ces résultats sont exposés dans les Chapitres 3, 4 et 5 de ce manuscrit.

Les mesures de RMN ^1H quantitatives ont aussi dû être adaptées. En effet, la spectroscopie est extrêmement sensible, ce qui peut s'avérer être un problème en conditions aqueuses. En effet, la résonance de l'eau, extrêmement abondante peut induire des problèmes de phases et de sensibilité relative aux composés d'intérêt faiblement présents dans la solution aqueuse. Ainsi, nous avons dû recourir à l'utilisation de séquences de suppression du signal du solvant. Comme discuté par Giraudeau *et al.*¹⁵, les méthodes de suppression de l'eau sont nombreuses et un contrôle précis des paramètres doit être appliqué pour être quantitatif sur les résonances proches du signal supprimé. Dans notre cas, nous avons utilisé la séquence appelée « zgpr » (dans la terminologie Bruker) qui consiste à présaturer le signal de l'eau puis à procéder à l'acquisition. Cela a pour effet de grandement réduire l'intensité du signal de l'eau. De manière à être sûr de l'analyse quantitative, nous avons observé l'évolution du signal des groupements méthylènes de l'acide polyaspartique au cours du temps. Ce signal vers 2,7 ppm est situé suffisamment loin du signal de l'eau. Ces résultats sont présentés dans le Chapitre 5 de ce manuscrit. Un exemple de spectre ^1H avec et sans présaturation sur le signal du solvant est présenté en Figure 10. Le spectre en Figure 10B présente d'une solution contenant un tampon, le TRIS,

enregistré sans présaturation. Le signal vers 4,7 ppm est le signal de l'eau alors que le signal vers 3,5 ppm à peine visible sur la figure est le signal du TRIS. Après présaturation (Figure 10A), nous voyons clairement mieux le signal du TRIS. Sur ce dernier spectre, nous pouvons observer le couplage scalaire J hétéronucléaire $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (≈ 72 Hz) vers 3,8 et 3,3 ppm. Comme nous pouvons le constater, celui-ci est très peu intense et ne complique pas, dans notre cas, l'interprétation des spectres.

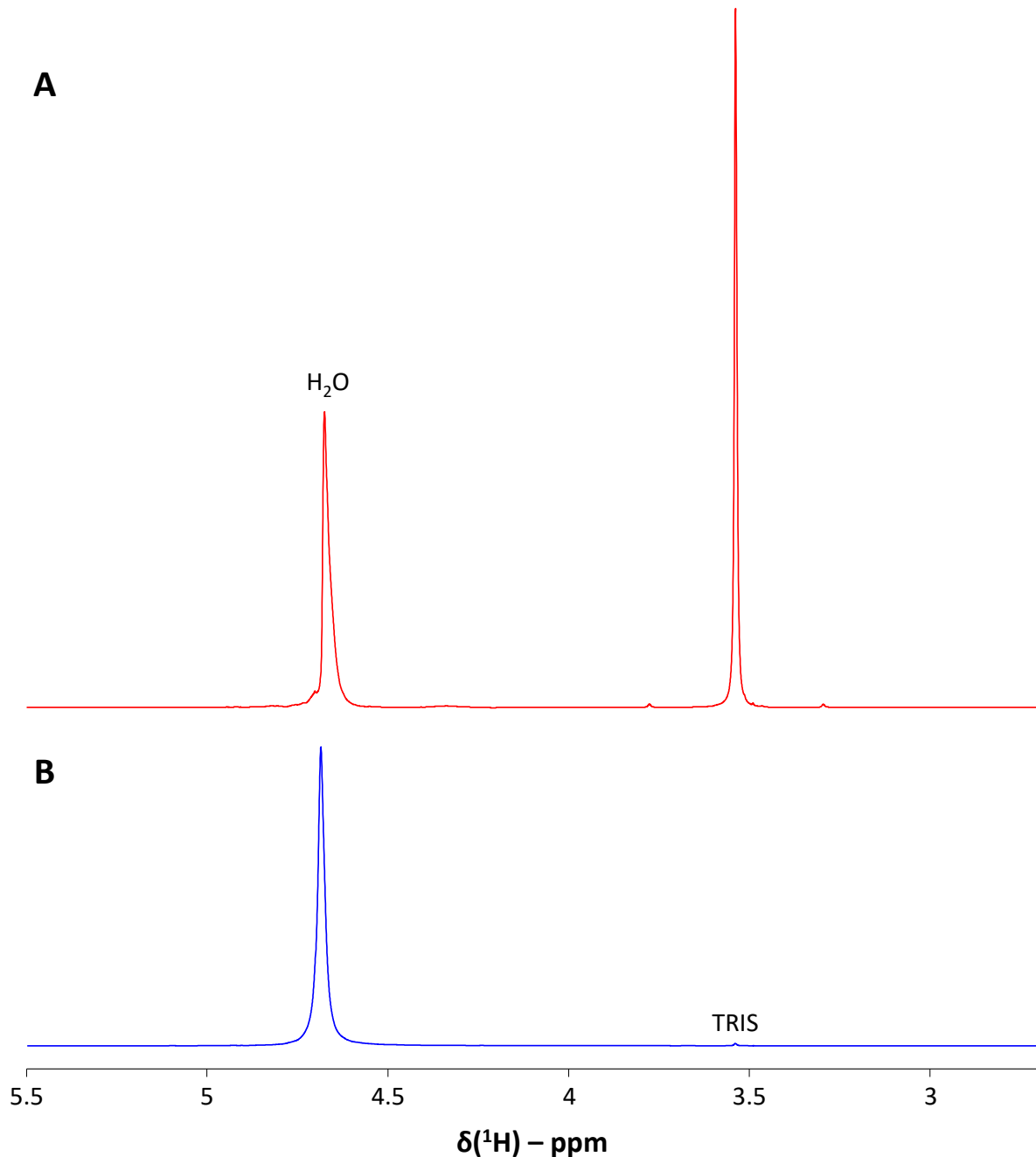


Figure 10 : Spectres ^1H d'une solution contenant du tampon TRIS (A) avec et (B) sans la suppression du signal de l'eau. Les spectres ont été normalisés à l'intensité du signal de l'eau détectée pour mieux rendre compte du gain de sensibilité relative sur les autres signaux.

4) Les phénomènes d'échanges chimiques

La dernière notion importante de la RMN en solution nécessaire à la compréhension des résultats exposés dans ce manuscrit concerne la notion d'échange chimique. Ce phénomène est prépondérant dans la RMN en solution. L'exemple le plus parlant se rapporte aux protons dits « labiles ». En effet, les protons portés par des fonctions alcools, amines, acides ou amides ont la possibilité de s'échanger avec les protons du solvant¹⁶. Cela s'applique de manière générale à tous les protons susceptibles de participer à des réseaux de liaisons H. Il en résulte que le déplacement chimique ^1H de ces protons peut varier drastiquement. Il est parfois impossible de les détecter car le signal est trop large et se confond dans la ligne de base. Concrètement, cet exemple traduit la notion d'échange chimique au cours duquel un atome ou groupement d'atomes passe d'un site à l'autre dans une molécule ou d'une molécule à une autre. Ce phénomène implique des ruptures et créations de liaison. Le phénomène d'échange chimique se retrouve dans de nombreuses situations telles que :

- La complexation
- Les équilibres de protonation/déprotonation (c'est-à-dire acido-basiques)
- Echanges isotopiques
- Réactions catalysées par des enzymes
- Mouvements des chaînes latérales des protéines
- Changement de conformation d'une protéine
- Participation à des réseaux de liaisons H

Dans ce type de processus, et du point de vue de la RMN, la notion de cinétique d'échange est primordiale¹⁷. On distingue 2 régimes de cinétique d'échange extrêmes. Pour cela, on imagine 1 spin pouvant passer d'une situation A à une situation B, où A et B représentent par exemple le spin à l'état libre et à l'état lié, respectivement. Cet exemple traduit une situation de complexation. Les vitesses pour passer de l'état A à B et inversement sont dénotées ici k_{ON} et k_{OFF} . La vitesse d'échange k_{ex} est calculée comme $k_{\text{ex}} = k_{\text{ON}} + k_{\text{OFF}}$. Il faut ensuite considérer l'écart de fréquence entre les résonances de A et B pures. Dans le premier cas extrême, si cet écart de fréquence $\Delta\nu = |\nu_A - \nu_B|$ est largement supérieur à la vitesse d'échange k_{ex} , alors on est dans une situation d'échange lent. Ce régime traduit par exemple une complexation forte. Le spectre RMN correspondant présente ainsi les 2 fréquences correspondants aux états A et B à leur déplacement chimique, largeur à mi-hauteur et relaxation propres. Dans l'autre cas extrême, l'écart de fréquence $\Delta\nu$ est largement inférieur à la vitesse d'échange. On est alors en présence d'un régime d'échange rapide où le signal observé est moyenné en termes de déplacement chimique, largeur à mi-hauteur et de relaxation, par les proportions respectives de A et B. Ces concepts de régime d'échange sont présentés en Figure 11. Ainsi la complexation est un phénomène qui peut être étudié par la RMN en solution. Fortement dépendant du régime d'échange rapide, il est parfois possible de déterminer des informations dynamiques¹⁸ et structurales¹⁹. Comme explicité ci-dessus, le déplacement chimique, la largeur des signaux et les propriétés de relaxation sont autant de données permettant de distinguer les états A et B ainsi que leurs proportions respectives. Néanmoins, ce n'est pas toujours le cas. Typiquement, le signal des espèces liées est parfois si large qu'aucune interprétation ne peut être tirée. Cet effet est principalement relié aux régimes d'échange lents et intermédiaires. D'autre part et dans le cas d'un échange rapide, les espèces liées et libres ne peuvent pas être discriminées sans ambiguïtés en termes de déplacement chimique, largeur à mi-hauteur ou relaxation. Dans ce cas, A et B sont très proches et

il est difficile d'aller plus loin dans l'analyse. On peut par exemple faire varier la température pour modifier le régime d'échange.

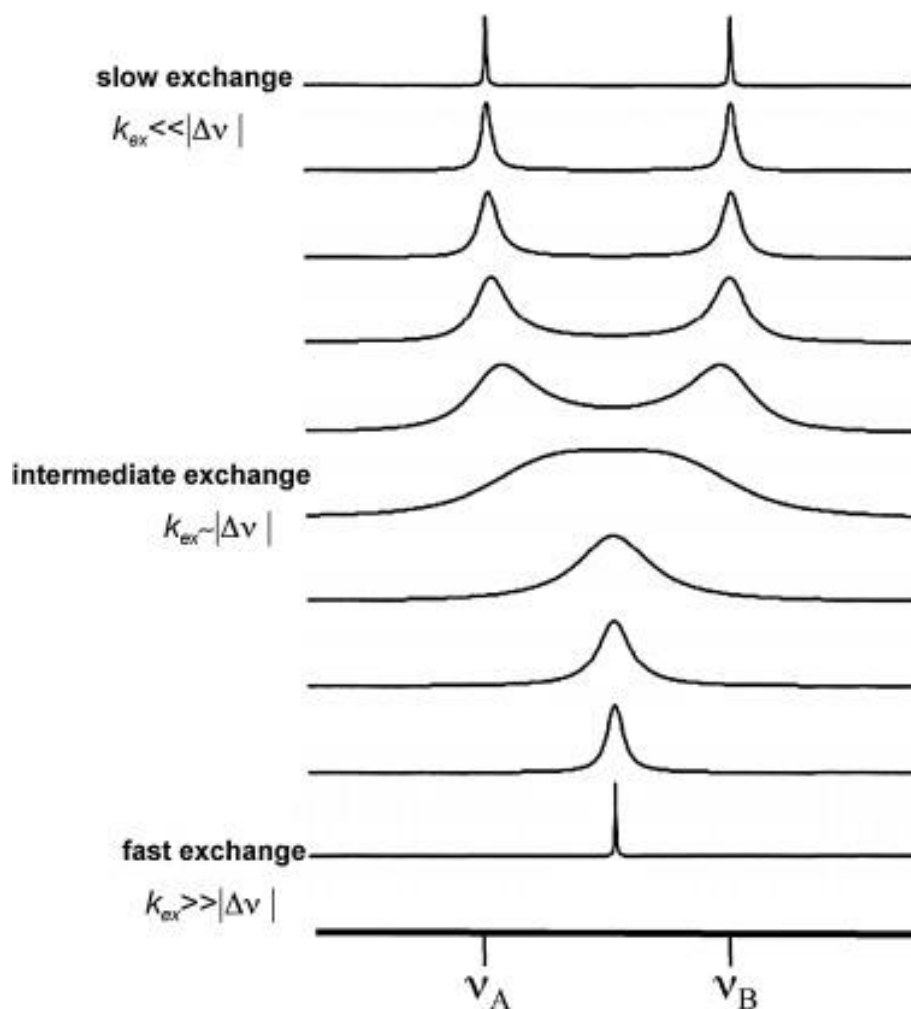


Figure 11 : Représentation schématique des régimes d'échanges en RMN en solution. Figure reproduite d'après Gerothanassis *et al.*²⁰

Ces concepts seront retrouvés dans la suite de ce manuscrit, car il s'avère que les espèces de prénucléation sont en échange rapide ou intermédiaire, selon les cas, avec les ions libres en solution. Par ailleurs, les complexations du calcium par l'acide aspartique et son polymère, l'acide polyaspartique, ont été étudiés par RMN en solution.

III. La RMN à l'état solide

Les échantillons solides ne peuvent pas être étudiés par RMN en solution. La RMN à l'état solide a donc été développée pour étudier des poudres (cristallines ou amorphes) et des monocristaux. Dans ce cas, les signaux détectés correspondent à des sites cristallographiques. Dans les prochains paragraphes, nous allons présenter les concepts et spécificités de la RMN à l'état solide. L'ouvrage de Duer²¹ représente une bonne base pour décrire ces notions. Cette technique a beaucoup été utilisée

dans le cadre de cette thèse. Aussi, les séquences d'impulsion invoquées dans ce manuscrit seront détaillées.

1) Rotation à l'angle magique

Contrairement à la RMN en solution, la RMN à l'état solide ne bénéficie pas du mouvement brownien moyennant les interactions anisotropes et souffre ainsi d'un nombre de degrés de liberté réduit. Néanmoins, l'image d'un solide totalement immobile est erronée, car il subsiste tout de même des fluctuations à l'état solide. En 1959, Andrew *et al.*²² et Lowe²³ mettent en évidence que la rotation d'un solide à un certain angle, par rapport au champ magnétique B_0 , permet de gagner énormément en résolution. Cet angle se trouve être la solution au polynôme de Legendre trouvé dans toutes les expressions arithmétiques des interactions anisotropes : $\frac{1}{2}(3\cos^2\psi - 1) = 0$. La solution à cette équation se trouve être un angle $\psi = 54,74^\circ$ appelé angle magique. C'est de là qu'est née la technique de la rotation à l'angle magique ou MAS (Magic-Angle Spinning). Le principe de cette technique consiste à faire tourner un rotor contenant l'échantillon à des fréquences de rotation élevées ν_{ROT} à un angle de $54,74^\circ$ par rapport au champ magnétique B_0 (Figure 12).

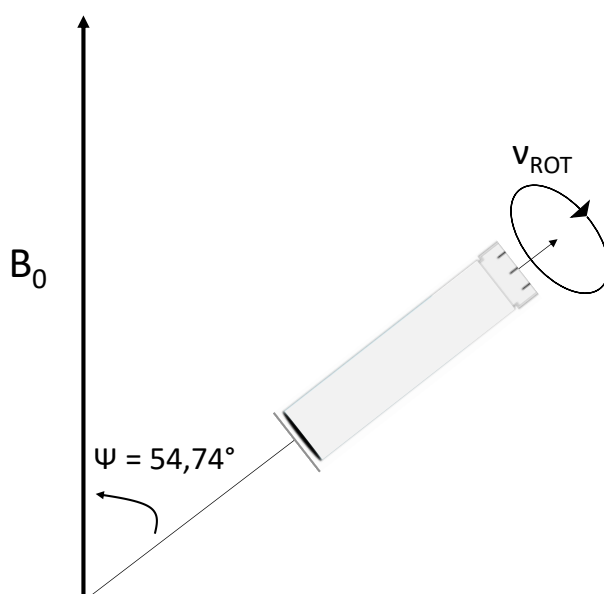


Figure 12 : Représentation schématique de la rotation à l'angle magique ou MAS.

En pratique, la fréquence de rotation à cet angle magique doit être suffisamment élevée, au moins de l'ordre de grandeur de l'anisotropie de déplacement chimique (CSA) et de l'interaction dipolaire, pour obtenir une résolution suffisante. Il faut alors trouver un compromis entre fréquence de rotation et quantité d'échantillon, car la vitesse des rotors pour RMN à l'état solide est limitée par sa taille, et donc par la quantité d'échantillon pouvant être insérée²⁴.

2) Anisotropie de déplacement chimique

L'anisotropie de déplacement chimique, ou CSA, est l'une de ces interactions anisotropes. Son origine provient du déplacement chimique déjà décrit précédemment en solution. En effet, les noyaux sont entourés d'un nuage électronique qui, en présence d'un champ magnétique, écrantent ce dernier.

Dans un milieu anisotrope, typiquement un solide, le nuage électronique créé peut être exprimé comme un tenseur d'ordre 2 $\bar{\sigma} = \sigma_a + \sigma_s$ composé d'une partie symétrique et antisymétrique. Si la partie antisymétrique ne participe que très peu au signal RMN, la partie symétrique est diagonalisable dans son système d'axes propres pouvant s'écrire dans le repère cartésien tel que :

$$\begin{pmatrix} \sigma_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{zz} \end{pmatrix}$$

Qui dit 3 constantes d'écrantage, dit 3 déplacements chimiques différents. Le tenseur correspondant est similaire :

$$\delta_s = \begin{pmatrix} \delta_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \delta_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \delta_{zz} \end{pmatrix}$$

Sa représentation graphique correspond à un ellipsoïde (Figure 13). Sur cette figure, on peut lire 3 déplacements chimiques qui dépendent de l'orientation du cortège électronique. Ainsi, pour n'importe quel composé anisotrope on observera sur le spectre une distribution de toutes les orientations comprises entre ces 3 déplacements chimiques en l'absence de rotation à l'angle magique, leur intensité relative variant en fonction de l'orientation du cristal selon B_0 . Au lieu de raisonner en fonction de 3 déplacements chimiques différents, il est d'usage de calculer 3 autres paramètres selon la convention proposée par Haeberlen²⁵. On définit ainsi le déplacement chimique isotrope comme $\delta_{iso} = \frac{1}{3} \times \text{Tr}(\delta_s)$, soit comme la moyenne des 3 déplacements chimiques δ_{xx} , δ_{yy} et δ_{zz} . Ce dernier n'est rien d'autre que le déplacement chimique observé en RMN en solution et correspondrait au déplacement chimique d'un composé observé par RMN à l'état solide à fréquence de rotation infinie. Par convention, on a : $|\delta_{yy} - \delta_{iso}| \leq |\delta_{xx} - \delta_{iso}| \leq |\delta_{zz} - \delta_{iso}|$. L'anisotropie de déplacement chimique se calcule comme étant $\Delta_{CSA} = \delta_{zz} - \delta_{iso}$. Cette grandeur est liée à la largeur spectrale du CSA. Enfin, l'asymétrie de l'anisotropie de déplacement chimique est calculée telle que $\eta_{CSA} = \frac{|\delta_{yy} - \delta_{xx}|}{\Delta_{CSA}}$. Elle est comprise entre 0 et 1 et définit la symétrie du CSA.

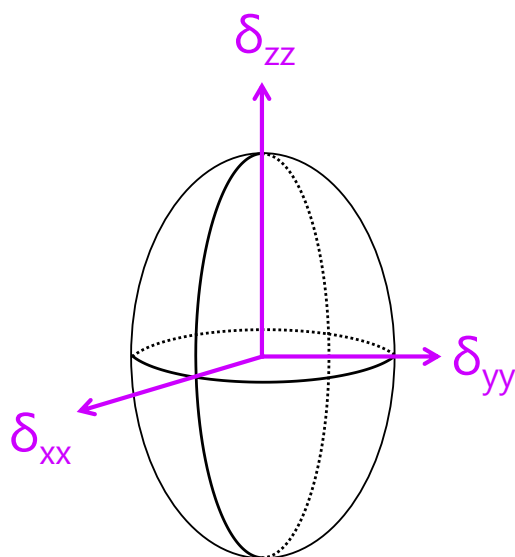


Figure 13 : Représentation graphique du tenseur de déplacements chimiques anisotropes en présence d'un champ magnétique B_0 . Cette situation correspond à une fréquence de rotation nulle, c'est pourquoi l'orientation de B_0 n'a pas d'importance ici.

Un exemple expérimental du CSA de la brushite par RMN ^{31}P est présenté en Figure 14. L'ajustement du spectre expérimental est présenté en Figure 14A. Nous y retrouvons le déplacement chimique isotrope entouré de signaux d'intensités variables. Ces derniers sont nommés « bandes de rotation ». Elles apparaissent sur le spectre à des multiples de la fréquence de rotation du signal isotrope car l'utilisation d'une vitesse de rotation intermédiaire ne permet pas de moyenner complètement le CSA. A partir de la simulation de leurs intensités relatives, il est possible de calculer les paramètres Δ_{CSA} et η_{CSA} . Pour cela, il peut être utile de travailler à hauts champs magnétiques, car cela permet d'exacerber l'effet du CSA. A partir des paramètres Δ_{CSA} et η_{CSA} déterminés, nous avons ensuite simulé le spectre à fréquence de rotation quasi-infinie, ici 100 kHz, dans lequel nous n'observons que le déplacement chimique isotrope δ_{iso} (Figure 14B). Enfin, nous avons simulé le spectre en conditions statiques dans lequel nous pouvons retrouver les 3 déplacements chimiques δ_{xx} , δ_{yy} et δ_{zz} (Figure 14C).

Le CSA d'un signal dépend de plusieurs paramètres qui sont reliés à la symétrie de la molécule et au cortège électronique autour du noyau observé. A titre d'exemple, les CSA du ^{31}P pour des sels de phosphates liés à des cations monovalents dépendent directement de l'état de protonation des phosphates. En effet, les sels de phosphate protonés 2 fois montrent un fort CSA négatif (Figure 15A), les sels de phosphate protonés 1 fois ont un CSA positif (Figure 15B) et les sels de phosphates totalement déprotonés ont un CSA quasiment nul (Figure 15C). Les paramètres CSA déterminés sont consignés dans le *Tableau 2*. C'est une propriété qui sera exploitée dans le chapitre V de ce manuscrit. Le cation autour des phosphates peut aussi avoir un effet sur le CSA²⁶.

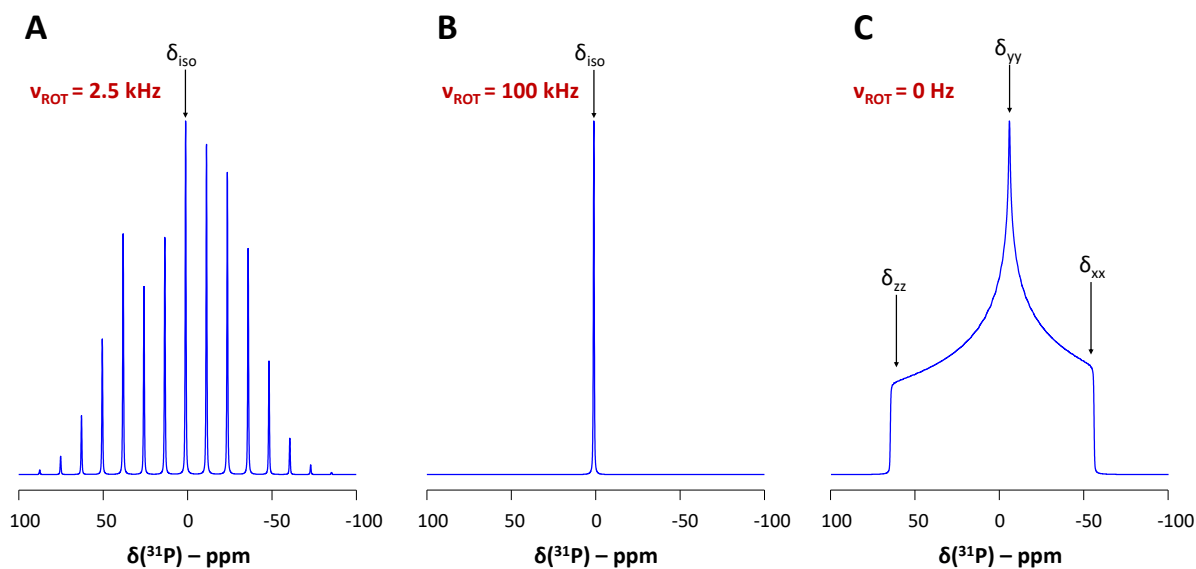


Figure 14 : Spectres ^{31}P de la brushite pour $v_{\text{ROT}} = 2,5$ kHz (A), 100 kHz (B) et 0 Hz (C).

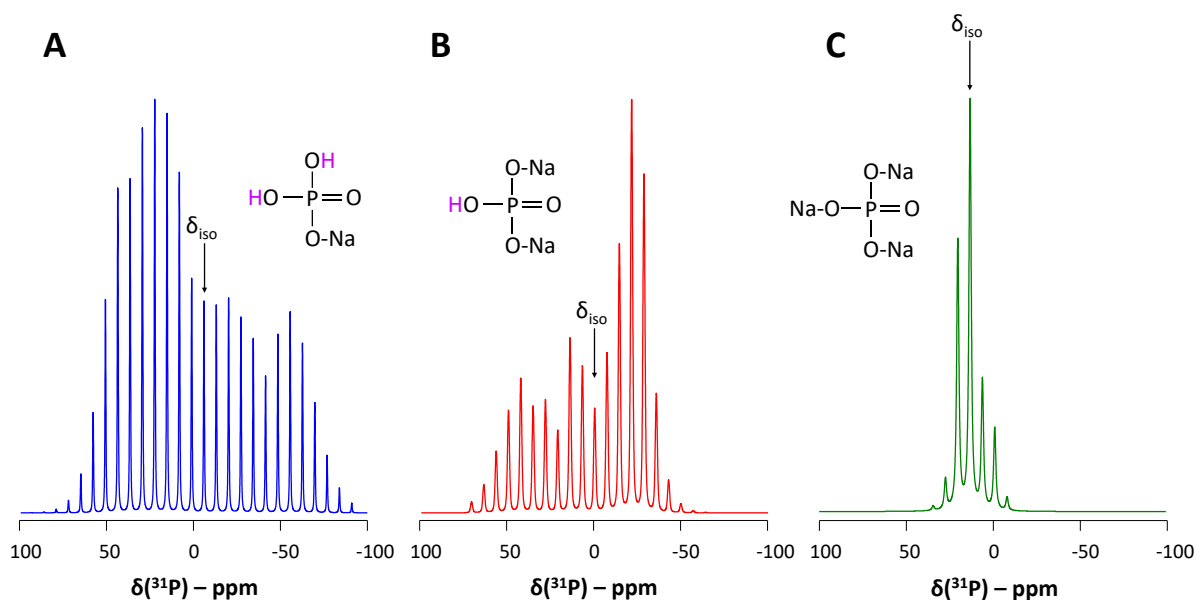


Figure 15 : Spectres ^{31}P ($v_{\text{ROT}} = 2$ kHz,) de (A) NaH_2PO_4 , (B) Na_2HPO_4 et (C) Na_3PO_4 simulés à $v_{\text{ROT}} = 2$ kHz sur un spectromètre 700.

Composé	Δ_{CSA} (ppm)	η_{CSA}
NaH_2PO_4	-79,6	0,47
Na_2HPO_4	63,3	0,15
Na_3PO_4	-16,8	0,17

Tableau 2. Paramètres CSA déterminés de sels de phosphates de sodium avec différents états de protonation.

3) Interaction dipolaire

L'interaction dipolaire provient de la proximité spatiale de 2 spins. Lorsque ces 2 spins i et j sont suffisamment proches, ils ne peuvent plus être considérés comme des moments magnétiques isolés. Le moment magnétique de i influence le moment magnétique de j et *vice versa* (Figure 16). L'expression d'une telle interaction peut être résumée de la manière suivante :

$$D_{ij} \propto \frac{\gamma_i \gamma_j}{r^3} (3\cos^2\theta - 1)$$

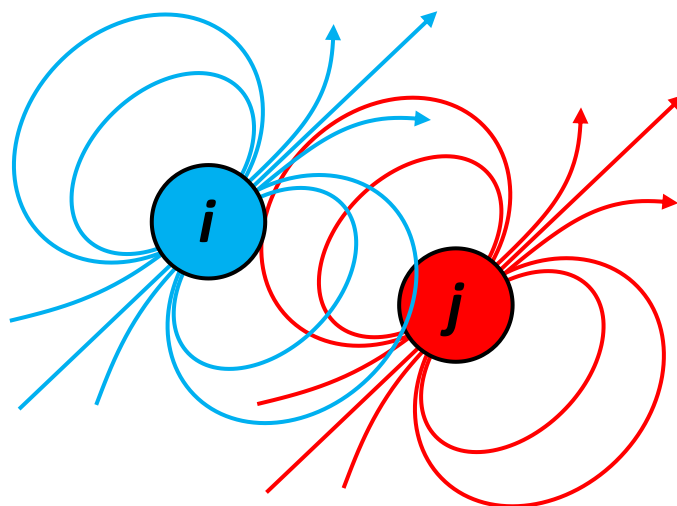


Figure 16 : Représentation schématique de l'interaction dipolaire entre 2 spins i et j .

Où D_{ij} est le couplage dipolaire, r est la distance entre les 2 spins et θ l'angle de la liaison ij avec le champ magnétique B_0 . Nous remarquons tout d'abord la forte dépendance de cette interaction avec la distance internucléaire. De plus, cette interaction dépend des rapports gyromagnétiques γ_i et γ_j des noyaux impliqués, c'est-à-dire que le couplage dipolaire sera d'autant plus élevé que les rapports gyromagnétiques impliqués le seront. Notons que cette interaction peut s'appliquer entre 2 types de noyaux différents, il s'agira alors d'une interaction dipolaire hétéronucléaire, mais qu'elle peut aussi s'exercer sur 2 noyaux identiques. Dans ce dernier cas, il s'agira de l'interaction dipolaire homonucléaire. Il en résulte que l'interaction dipolaire homonucléaire $D(^1\text{H}-^1\text{H})$ est potentiellement la plus élevée à prendre en compte.

Nous notifions la dépendance de cette interaction à un terme en $(3\cos^2\theta - 1)$. Lorsque l'on étudie une poudre, les cristaux qui la composent sont orientés différemment par rapport au champ magnétique. A fréquence de rotation nulle, la somme de ces contributions mène à l'observation d'un massif symétrique (Figure 17A) reconnaissable comme un doublet de Pake²⁷. La lecture approximative du couplage dipolaire peut se lire directement à partir des sommets symétriques du doublet de Pake observé. Ce terme peut cependant s'annuler en exploitant la rotation à l'angle magique (pour $\theta = 54,74^\circ$). En pratique, l'interaction dipolaire peut être totalement annulée si la fréquence de rotation est suffisamment élevée, plus élevée que cette interaction dipolaire (Figure 17B). On retrouve alors un signal sans bande de rotation centré autour du déplacement chimique isotrope. A fréquence de

rotation intermédiaire, l'interaction dipolaire se traduit par des bandes de rotation (Figure 17C, Figure 17D).

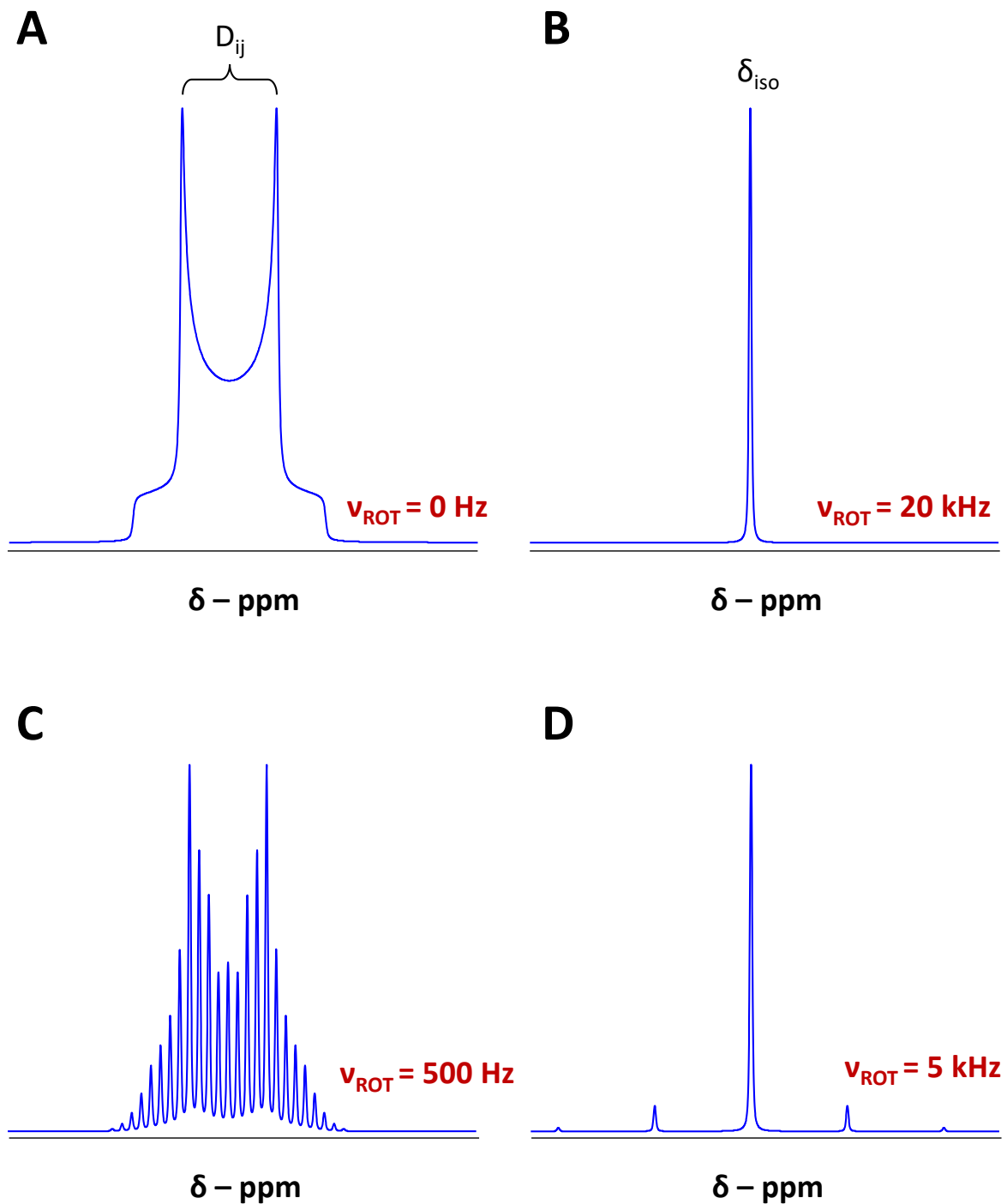


Figure 17 : Spectre présentant un couplage dipolaire de 5 kHz simulé à (A) $v_{\text{ROT}} = 0 \text{ Hz}$, B) $v_{\text{ROT}} = 20 \text{ kHz}$, C) $v_{\text{ROT}} = 500 \text{ Hz}$ et D) $v_{\text{ROT}} = 5 \text{ kHz}$. Le CSA a ici été fixé à 0 de manière à ne montrer que les caractéristiques intrinsèques de l'interaction dipolaire sous l'effet de la rotation à l'angle magique.

Comme énoncé plusieurs fois, cette interaction est fortement dépendante de la distance entre les noyaux. L'étude de cette interaction permet potentiellement la mesure de distances internucléaires. L'utilisation de cette interaction représente certainement une des plus grandes forces

de la RMN à l'état solide et beaucoup de principes en découlent. Dans les paragraphes qui suivent, nous présentons ces concepts, et plus particulièrement les différentes séquences d'impulsion que l'on retrouvera dans ce manuscrit de thèse.

4) Séquences d'impulsion utilisées

a) Acquisition directe et découplage hétéronucléaire

La séquence d'impulsion la plus simple est l'acquisition directe qui peut être résumée par une impulsion 90° suivie de l'acquisition du FID. Comme pour la RMN en solution, il est possible de se placer dans des conditions quantitatives en choisissant bien le délai entre les impulsions. Néanmoins, nous venons de décrire l'interaction dipolaire qui n'est plus négligeable pour la RMN à l'état solide. C'est particulièrement le cas pour le proton, noyau le plus abondant et présentant le rapport gyromagnétique le plus élevé. En pratique, les noyaux ^{13}C , ^{31}P et ^{43}Ca sont généralement bien moins abondants que les protons dans un échantillon donné. Les protons vont ainsi induire des couplages dipolaires aussi bien avec les hétéronoyaux qu'entre eux. Il en résultera alors des couplages résiduels qui ne pourront pas totalement être moyennés par la fréquence de rotation et qui se traduiront par un élargissement des signaux. Il est d'usage d'ajouter une étape de découplage durant l'acquisition dans l'objectif de limiter cet élargissement. Au cours du temps, plusieurs types de découplage hétéronucléaire ont été développés parmi lesquels les plus célèbres sont :

- Continuous Wave, ou cw : irradiation continue où seule la valeur du champ RF est optimisée.
- Two pulse phase-modulation, ou tppm : alternance d'impulsions de durée fixe et de phases opposées $+\frac{\Phi}{2}$ et $-\frac{\Phi}{2}$.
- Small Phase INcrementation ALternation with 64 steps, ou spinal64 : supercycles de phases modulées²⁸.

Dans le cadre de ce manuscrit, nous n'avons utilisé que la séquence de découplage spinal64 car jugée plus efficace que les autres²⁹. La séquence d'impulsion combinant acquisition directe et découplage hétéronucléaire s'appelle HPDEC (selon la terminologie Bruker) pour High Power DECoupling et est représentée en Figure 18.

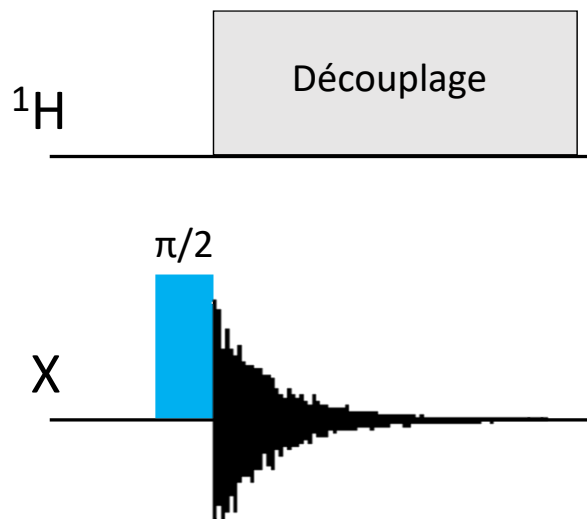


Figure 18 : Séquence d'impulsion HPDEC

b) Polarisation croisée CP

Une autre technique, centrale à la RMN à l'état solide ainsi que dans le cadre de cette thèse, s'appelle la polarisation croisée ou CP. Combinée à la rotation à l'angle magique, cette technique est dénommée CPMAS. Cette dernière exploite l'interaction dipolaire pour transférer la polarisation d'un spin abondant I à un spin moins abondant S à travers l'espace. Cette technique peut être utilisée pour diverses raisons, telles que l'obtention d'un gain en sensibilité (gain théorique de $\frac{\delta_I}{\delta_S}$) ou pour réaliser de l'édition spectrale. Tout d'abord, le spin abondant est polarisé par une impulsion à 90°. Cette magnétisation est ensuite verrouillée par le biais d'une impulsion continue pendant une durée appelée « temps de contact ». Parallèlement, une impulsion continue est appliquée sur le spin peu abondant. Cette étape s'appelle le « spin-lock ». Les champs RF appliqués sur les 2 populations de spin doivent satisfaire la condition de Hartmann-Hahn³⁰ qui s'exprime :

- A fréquence de rotation nulle : $|\omega_I| = |\omega_S| \Rightarrow \gamma_I B_{1I} = \gamma_S B_{1S}$
- A fréquence de rotation ω_R : $|\omega_I| = |\omega_S| \pm n\omega_R$, où n est un entier.

Si la condition de Hartmann-Hahn est remplie, la polarisation du spin abondant est transférée au spin moins abondant et l'acquisition se fait sur le spin peu abondant. Pendant l'acquisition et pour les mêmes raisons qu'énoncées précédemment, un découplage hétéronucléaire est usuellement appliqué. La séquence d'impulsion est représentée en Figure 19.

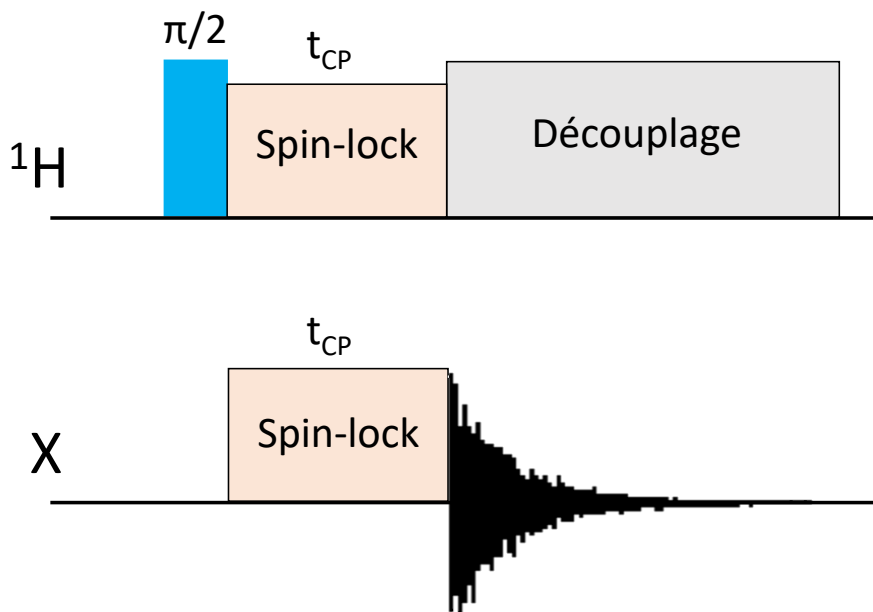


Figure 19 : Séquence d'impulsion CP

Usuellement et dans ce manuscrit, le noyau abondant I est ^1H . L'avantage de polariser premièrement ce noyau est de bénéficier de sa relaxation longitudinale plus rapide, de l'ordre de la seconde à la dizaine de secondes que certains noyaux observés tels que le ^{13}C ou le ^{31}P . Couplée au gain de sensibilité, cette technique permet d'enregistrer un spectre rapidement. Elle représente de ce fait un mode d'excitation trouvé dans de nombreuses séquences d'impulsion. Néanmoins, il faut avoir des protons proches spatialement pour que celle-ci fonctionne, car elle est basée sur l'interaction dipolaire. Les signaux détectés correspondent alors à des espèces protonées et/ou proche spatialement de protons ce qui permet de réaliser de l'édition spectrale. En principe, le temps de contact t_{CP} est un paramètre que l'on peut augmenter ou réduire de manière à détecter de plus grandes ou plus petites distances $^1\text{H}-\text{X}$. Par ailleurs, le temps de contact optimal dépend du paramètre de relaxation $T_{1\rho}$ correspondant au temps de relaxation longitudinal dans le repère tournant. Ce dernier correspond à un temps caractéristique analogue au T_1 , sauf qu'il décrit la perte de magnétisation d'une impulsion radiofréquence verrouillée par un spinlock³¹. L'analyse de la variation de polarisation en fonction du temps de contact permet de déterminer $T_{1\rho}$ et de déterminer des informations relatives au transfert de polarisation³².

c) Hetcor et découplage homonucléaire

La version bidimensionnelle de la polarisation croisée est l'Hetcor. La séquence d'impulsion est la même à la différence qu'un délai d'évolution t_1 est introduit après l'impulsion 90° . Ce délai permet de reconstruire l'évolution de l'aimantation dans la dimension indirecte I. En pratique, on recourt à l'enregistrement de plusieurs dizaines d'incrément t_1 , plus le nombre d'incrément étant élevé, plus la résolution spectrale sur la dimension indirecte reconstruite est meilleure. Après l'application d'une double transformée de Fourier, on obtient une carte bidimensionnelle dont les tâches représentent les corrélations spatiales entre les spins I et les spins S. La séquence d'impulsion est présentée en Figure 20.

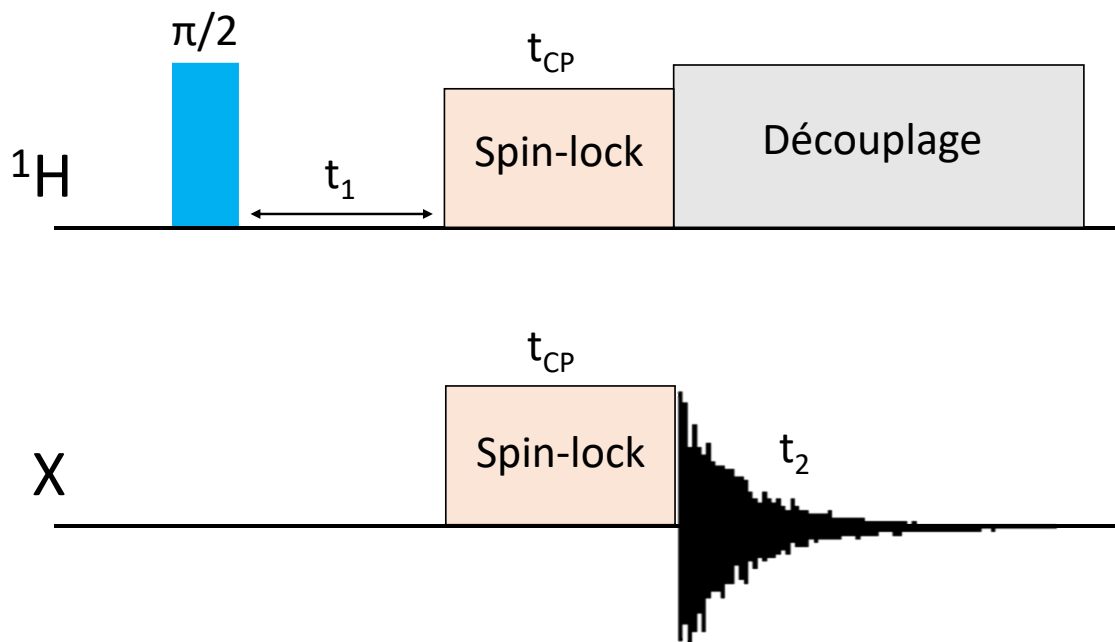


Figure 20 : Séquence d'impulsion 2D Hetcor.

La dimension indirecte est assujettie aux couplages dipolaires homonucléaires qui peuvent être élevés dans le cas du proton. A défaut de pouvoir tourner suffisamment vite, il peut alors être utile d'ajouter une étape de découplage homonucléaire telle que le DUMBO³³, basé sur l'utilisation de pulses dont la phase est continuellement modulée (Decoupling Using Mind-Boggling Optimization) ou le FSLG (Frequency-Switched Lee Goldberg). Nous avons utilisé ces 2 types de découplage homonucléaire dans le cadre de cette thèse, bien que le FSLG était souvent préféré car plus facile à mettre en place et plus versatile. En effet, ce type de découplage utilise un champ RF qui permet de manipuler les spins et de les placer à l'angle magique selon le repère tournant, ce qui a pour effet de supprimer l'interaction dipolaire homonucléaire³⁴. Alors que le DUMBO nécessite l'optimisation de plusieurs paramètres, le FSLG nécessite seulement de calculer la puissance correspondante au champ RF de découplage appliqué. Plus ce champ RF est élevé et plus le découplage sera efficace. Le DUMBO et le FSLG ont une efficacité similaire³⁵ et présentent l'avantage d'exploiter un facteur d'échelle qui a pour conséquence d'éclipser les bandes de rotation parfois gênantes lors d'expériences à faibles fréquences de rotation. Les expériences Hetcor utilisant un découplage FSLG seront appelées LGHetcor dans la suite de ce manuscrit.

L'Hetcor permet d'établir des corrélations spatiales entre 2 noyaux différents sur la base du couplage dipolaire hétéronucléaire. Si on souhaite avoir des corrélations spatiales entre 2 noyaux identiques, il faut donc exploiter l'interaction dipolaire homonucléaire. Il existe plusieurs approches qui vont être décrites par 2 types de séquence dans les prochains paragraphes.

d) Recouplage homonucléaire basé sur la diffusion de spins (DARR)

Dans cette séquence, nous exploitons la diffusion de spin des protons pour corrélérer les noyaux peu abondants X ayant des interactions spatiales à longue portée. L'expérience consiste à exciter le noyau X par une étape de polarisation croisée. Une fois l'étape du spin-lock terminée, une impulsion à 90° sur la voie X permet de conserver la magnétisation le long de l'axe z et de marquer le début d'un

temps dit « de mélange ». Pendant ce temps de mélange est appliqué un champ RF permettant de recoupler l'interaction $^1\text{H}-\text{X}$ pendant le temps de mélange. Pendant ce temps de mélange, les spins excités s'échangent par le biais de la diffusion de spin ^1H . En effet, les spins peu abondants X sont fortement couplés aux protons, et les protons sont fortement corrélés entre eux. Pendant cette étape, le découplage hétéronucléaire est désactivé de manière à recoupler l'interaction dipolaire $^1\text{H}-\text{X}$. Une dernière impulsion 90° permet de basculer l'aimantation dans le plan xy et on procède à l'acquisition du FID. La séquence d'impulsion correspondante est présentée dans la Figure 21 ci-dessous. Cette séquence est appelée DARR (pour Dipolar Assisted Rotational Resonance)³⁷.

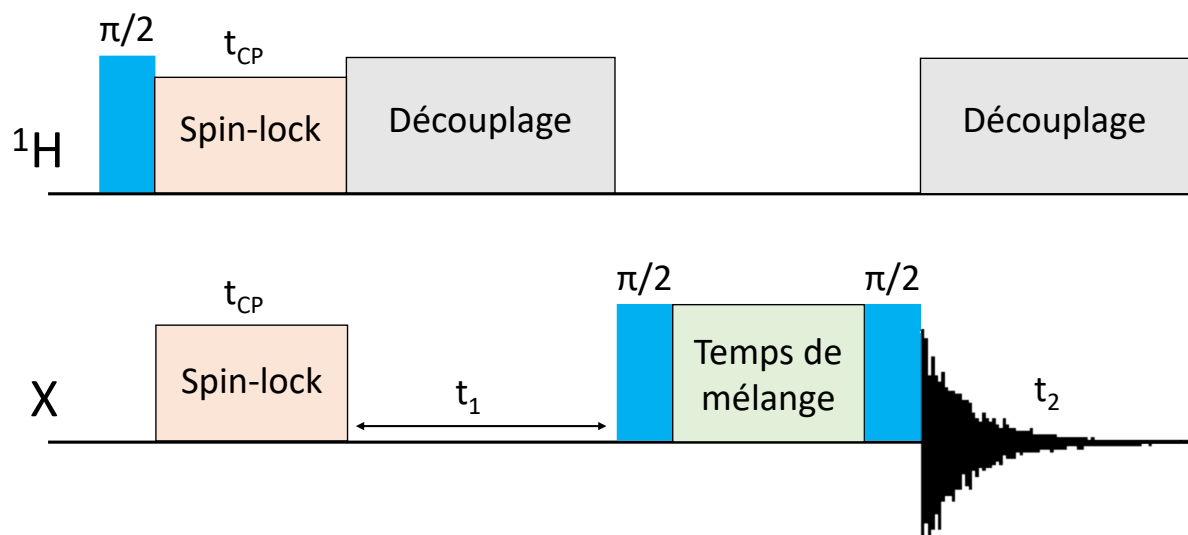


Figure 21 : Séquence d'impulsion 2D DARR

En pratique, un délai d'évolution t_1 est placé sur la voie X après l'excitation CP dans le but de faire évoluer le déplacement chimique de X. On enregistre plusieurs dizaines d'incrément t_1 de manière à avoir la meilleure résolution possible. Après une double transformée de Fourier, on obtient une carte bidimensionnelle X—X, dans laquelle les corrélations hors diagonales représentent les spins couplés entre eux et sont symétriques par rapport à la diagonale de la fenêtre spectrale (Figure 22). Comme cette expérience exploite la diffusion de spins, les résultats témoignent d'interactions de X relayés par le proton. En d'autres termes, s'il y a corrélation, cela veut dire que X_A est à proximité spatiale d'un proton lui-même à proximité de X_B . Une augmentation du temps de mélange (de quelques μs à plusieurs secondes) permet de sonder de plus grandes distances, mais l'expérience s'en retrouve alors plus longue.

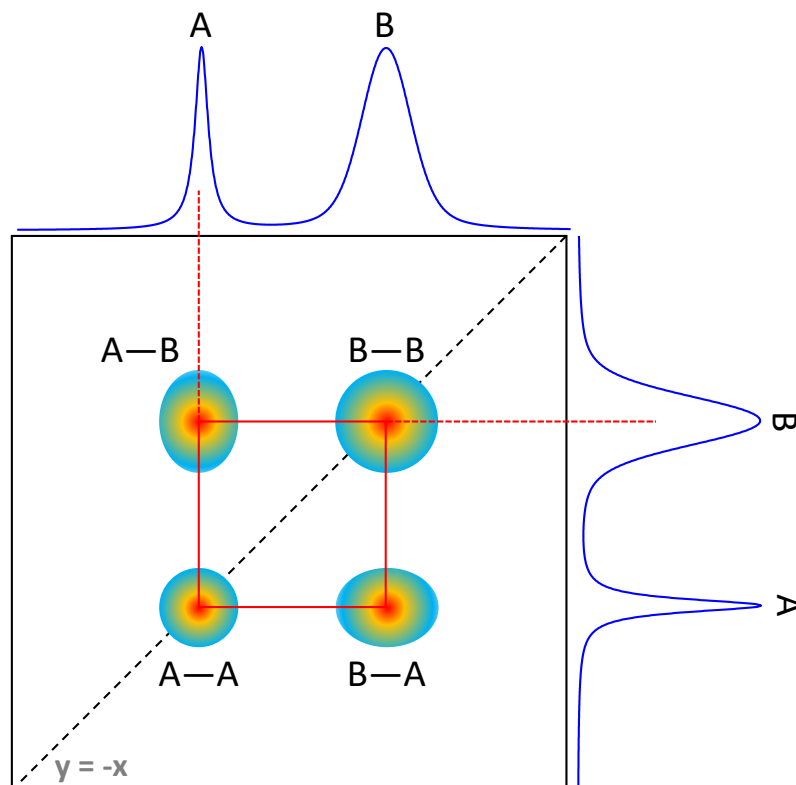


Figure 22 : Interprétation d'une 2D SQ—SQ

e) Recouplage homonucléaire basé sur la symétrie

Si on souhaite obtenir des interactions dipolaires homonucléaires à plus courte portée, il est nécessaire de se diriger vers d'autres approches. La difficulté réside dans la détection du faible couplage dipolaire homonucléaire partiellement moyenné par la rotation à l'angle magique. Plusieurs techniques permettent d'introduire le recouplage de cette interaction^{38,39}. L'approche utilisée dans ce manuscrit se base sur des méthodes de recouplage basé sur la symétrie. En particulier, ce type de séquence se base sur la synchronisation de pulses avec la durée nécessaire pour un rotor de tourner. Cela implique qu'en plus de manipuler le référentiel du laboratoire, c'est-à-dire le rotor placé dans le spectromètre et tournant à l'angle magique, il faut manipuler le référentiel du spin. Ces séquences synchronisées avec la rotation d'un rotor suivent la nomenclature de Levitt *et al.*⁴⁰ et permettent de supprimer ou de réintroduire différentes interactions. La notation introduite par Levitt peut être décrite en 2 grandes familles CN_n^v et RN_n^v où N impulsions sont incrémentées en phase pour former v rotations de spins pendant n périodes de rotor. Les indices C et R diffèrent par la somme des N pulses composites : 360° pour les séquences CN_n^v et une alternance de 180° et -180° pour les séquences RN_n^v . Celles qui nous intéressent et qui permettent de réintroduire le couplage dipolaire homonucléaire sont les séquences de type $C5\frac{1}{2}$, $C7\frac{1}{2}$ ou $C14\frac{5}{4}$ ⁴¹⁻⁴³. L'utilisation de ces séquences dépend de la taille du rotor, de la vitesse de rotation et des spécifications de puissances en termes de champ RF. Nous avons utilisé la première dans le cadre de ce manuscrit consistant en 5 pulses formant une rotation de spins pendant 2 périodes de rotor. En particulier, l'ajout d'un supercyclage de phase spécifique lui vaut le nom SPC5. La séquence peut être résumée par une excitation par polarisation croisée suivie d'un bloc d'excitation

de type post SPC5 ce qui a pour conséquence d'exciter les cohérences double-quantum DQ et de supprimer la cohérence simple-quantum SQ par cyclage de phase. La cohérence double-quantum est ensuite convertie en cohérence simple-quantum avant l'acquisition. En pratique, les 5 pulses d'excitation et de reconversion sont répétés X fois dans l'objectif de maximiser le signal (Figure 23). A partir de la croissance de la cohérence DQ, il est possible de remonter aux distances homonucléaires, bien que cela n'a pas été fait dans ce travail de thèse.

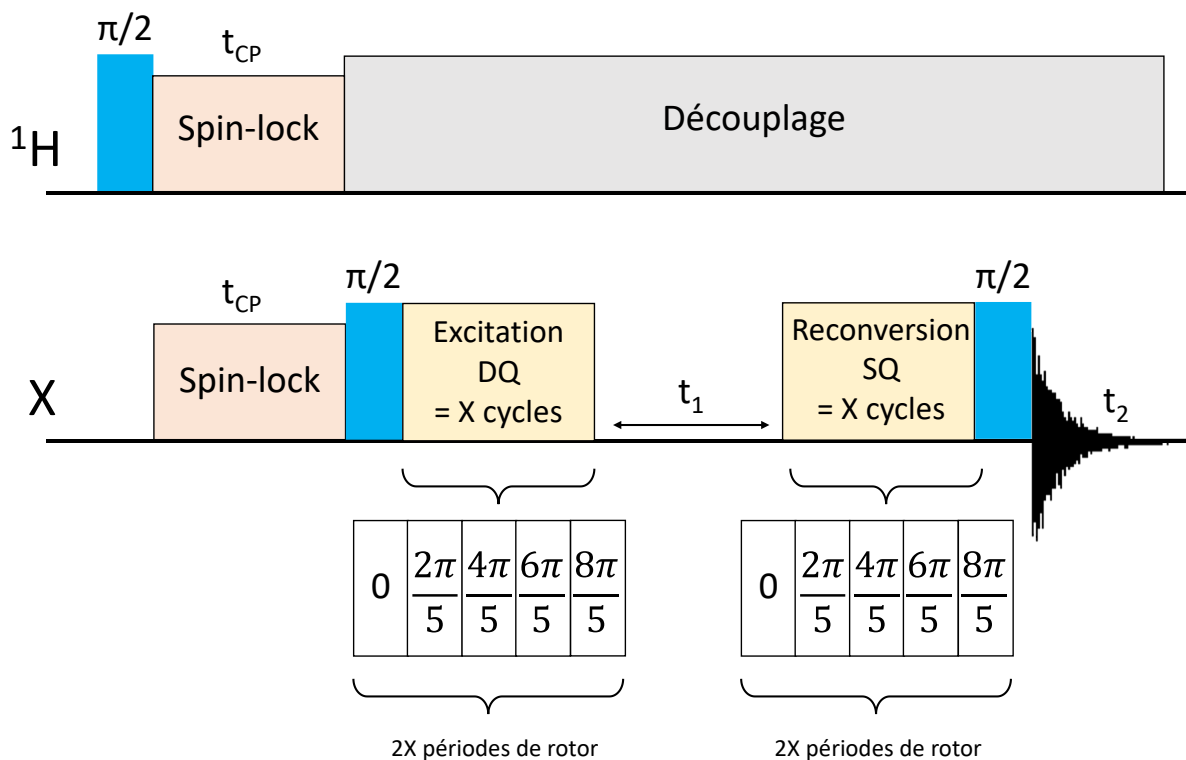


Figure 23 : Séquence d'impulsion 2D SPC5.

Le délai t_1 est ici placé après l'excitation des cohérences DQ de manière à laisser évoluer le déplacement chimique nécessaire à la reconstruction de la dimension indirecte. S'agissant d'une expérience DQ—SQ, la dimension indirecte est modifiée en déplacement chimique. La droite diagonale permettant d'identifier le déplacement chimique isotrope n'a plus une pente de 1 mais de 2 ($y = 2x$). Les tâches sur la diagonale montrent les corrélations d'un signal avec lui-même. Mais les corrélations hors diagonales se lisent différemment d'une expérience SQ—SQ. Par exemple, la corrélation d'un signal A à un signal B se repérera selon 2 tâches présentant des déplacements chimiques δ_A et δ_B sur la dimension directe, mais seulement un déplacement chimique $\delta_A + \delta_B$ sur la dimension indirecte (Figure 24).

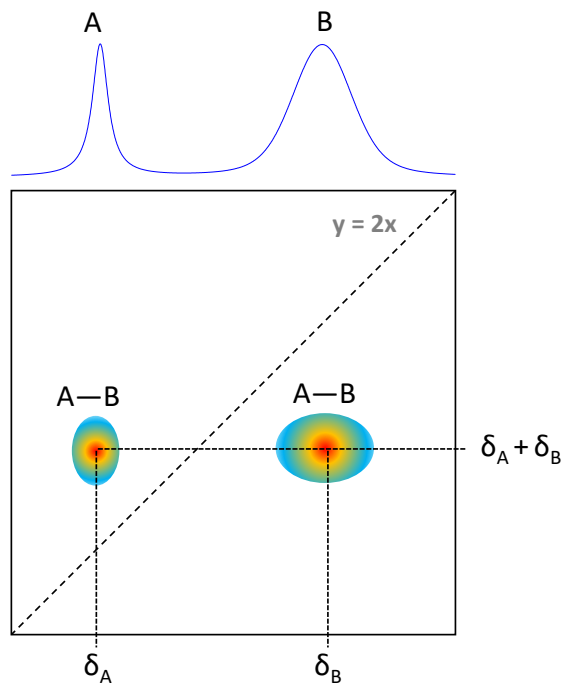


Figure 24 : Interprétation d'une expérience 2D DQ—SQ.

f) Double CP et CP aller-retour

Le CP aller-retour est une variante du double CP. Ce dernier consiste à effectuer 2 étapes de polarisation croisée, premièrement de ^1H à X, puis de X à Y. Il s'agit d'une méthode permettant de faire des expériences en triple résonance et d'enregistrer des spectres tridimensionnels en exploitant les différents couplages dipolaires. Dans ce cas, il faut successivement satisfaire à 2 conditions de Hartmann-Hahn.

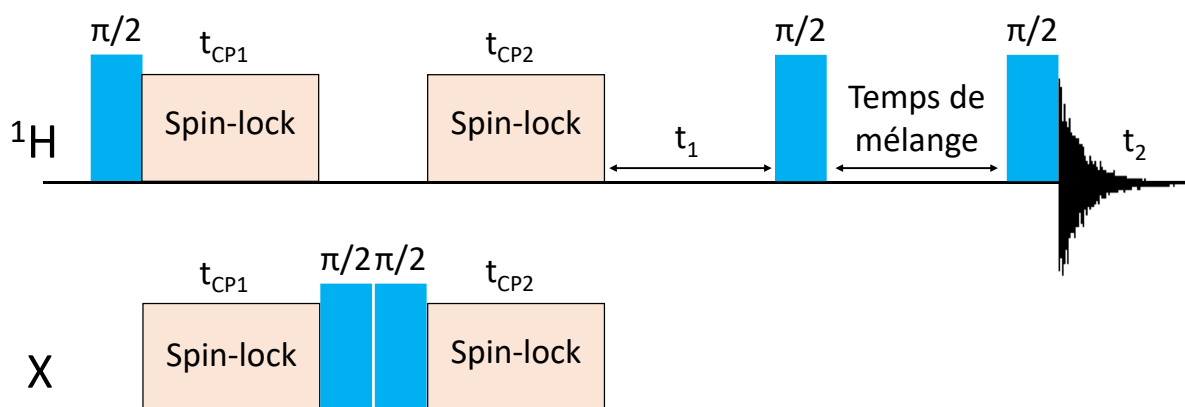


Figure 25 : Séquence d'impulsion 2D CP aller-retour combiné à un l'échange d'aimantation.

Nous n'avons pas utilisé cette séquence dans le cadre de cette thèse, mais nous avons utilisé le CP aller-retour. Cette séquence consiste à faire un premier CP pour exciter des spins X, puis de refaire un CP de X vers ^1H de manière à observer les protons « filtrés » par le spin X. Cela signifie que les

protons observés sont uniquement en interaction avec les spins X. Cela permet notamment de réaliser de l'édition spectrale. Dans ce manuscrit, nous avons combiné un bloc CP aller-retour avec un bloc de diffusion de spins de manière à pouvoir identifier les proximités spatiales ^1H — ^1H des protons couplés à X. Cette méthodologie s'avère très pratique pour étudier des interfaces ou des continuités spatiales dans des systèmes hétérogènes^{44,45}. La séquence est présentée ci-dessus en Figure 25.

g) Recouplage hétéronucléaire (REDOR)

Jusqu'ici, nous avons décrit les méthodes permettant de recoupler les interactions dipolaires homonucléaires et hétéronucléaires entre le proton et un noyau X. La méthode la plus simple et rapide expérimentalement permettant de recoupler l'interaction dipolaire hétéronucléaire entre 2 noyaux X et Y utilise la séquence d'impulsion REDOR (Rotational Echo DObble Resonance)⁴⁶. Pour ce faire, les spins X observés sont excités par polarisation croisée ou par simple impulsion 90° , après quoi des pulses 180° de refocalisation sont appliqués toutes les moitiés de période de rotor sur la voie Y, pendant que X est observé. Cela a pour effet de réintroduire le couplage dipolaire X—Y annihilé par la rotation à l'angle magique et de déphaser la magnétisation menant à une atténuation du signal observé. Usuellement, on enregistre 2 jeux de données avec et sans pulses de refocalisation de manière à soustraire l'expérience avec refocalisation à l'expérience de référence. L'expérience peut être répétée X fois pour différents temps d'irradiation, paramètre contrôlé par le nombre de périodes de rotor sous irradiation. Dans le cas d'un système simple, une paire de spin, il est alors possible de déterminer aisément la valeur du couplage dipolaire et de calculer des distances internucléaires X—Y⁴⁷. La détermination de faibles couplages dipolaires peut être facilitée par l'utilisation d'un cyclage de phase de type $xy8$ ⁴⁸, ce qui a été le cas dans ce travail doctoral. Dans ce cas, les X incréments se font tous les multiples de 8 périodes de rotor. La séquence correspondante est présentée en Figure 26.

Cette séquence clôture la partie dédiée à l'interaction dipolaire. Comme nous avons pu le constater, beaucoup des séquences utilisées en RMN à l'état solide, de manière générale, et dans le cadre de ce manuscrit exploitent l'interaction dipolaire par le biais d'une excitation CP. Cette technique apparaît comme une technique de base très efficace et facile à mettre en place dans le cas de spins $\frac{1}{2}$. Toutefois, son efficacité est compromise lorsque vient se mêler l'interaction quadripolaire.

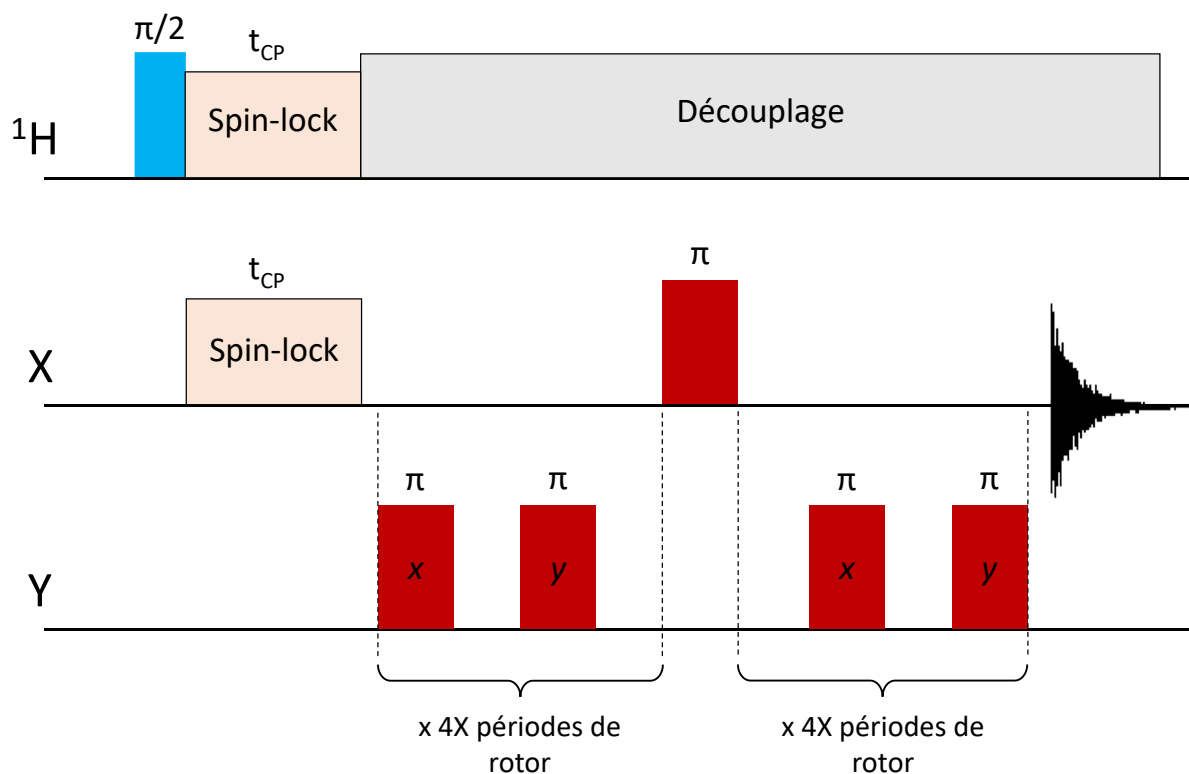


Figure 26 : Séquence d’impulsion REDOR avec cyclage de phase xy8.

5) Interaction quadripolaire

Cette dernière n’est observée que lorsque le noyau étudié est quadripolaire, c’est-à-dire que son nombre de spins est *stricto sensu* supérieur à ½. Elle concerne ainsi jusqu’à 75% des noyaux observables par RMN. Son origine provient d’une distribution inhomogène de charges nucléaires créant un moment quadripolaire électrique Q. L’interaction de Q avec le gradient de champ électrique local, autour du noyau quadripolaire, donne naissance à l’interaction quadripolaire. Le gradient de champ électrique local peut être exprimé dans son système d’axes propres :

$$V = \begin{pmatrix} V_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & V_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & V_{zz} \end{pmatrix}$$

L’interaction quadripolaire s’avère être plus conséquente que les autres interactions anisotropes telles que le CSA ou l’interaction dipolaire. Elle peut varier de plusieurs centaines de kHz à plusieurs centaines de MHz dans les cas les plus extrêmes⁴⁹ s’approchant parfois de l’ordre de grandeur de l’effet Zeeman. Comme pour le CSA et l’interaction dipolaire, l’interaction quadripolaire peut être écrite sous la forme d’un tenseur d’ordre 2 et être décrite par 2 paramètres :

- $C_Q = \frac{eQV_{zz}}{\hbar}$, où e est la charge de l’électron et C_Q est appelée la constante quadripolaire et s’exprime généralement en MHz.

- $\eta_Q = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}}$ désignant le paramètre d'asymétrie du gradient de champ électrique. η_Q est compris entre 0 et 1.

L'interaction quadripolaire étant très conséquente, son opérateur Hamiltonien \widehat{H}_Q doit être traité au premier ordre et au second ordre en perturbation : $\widehat{H}_Q = \widehat{H}_Q^{(1)} + \widehat{H}_Q^{(2)}$. Lorsque l'effet Zeeman est largement supérieur à l'interaction quadripolaire, cette dernière ne représente qu'une perturbation à l'effet Zeeman. Cela se résume à ne considérer que l'interaction quadripolaire au premier ordre qui n'affecte que les transitions dites « satellites ». En effet, un noyau de spin I peut subir $2I+1$ transition. Si dans le cas d'un spin $\frac{1}{2}$, seules 2 niveaux d'énergie sont considérés, ce n'est pas le cas d'un noyau quadripolaire. Par exemple, un spin $\frac{3}{2}$ aura 4 niveaux d'énergie, donc 3 transitions possibles (Figure 27). Il y aura d'autant plus de transitions satellites ST que le nombre de spin I sera élevé. La transition centrale CT correspond à la transition $\frac{-1}{2} \leftrightarrow \frac{+1}{2}$. Lorsque l'interaction dipolaire est proche de l'effet Zeeman, il faut alors prendre en compte le second ordre quadripolaire qui affecte aussi bien la transition centrale que les transitions satellites (Figure 27).

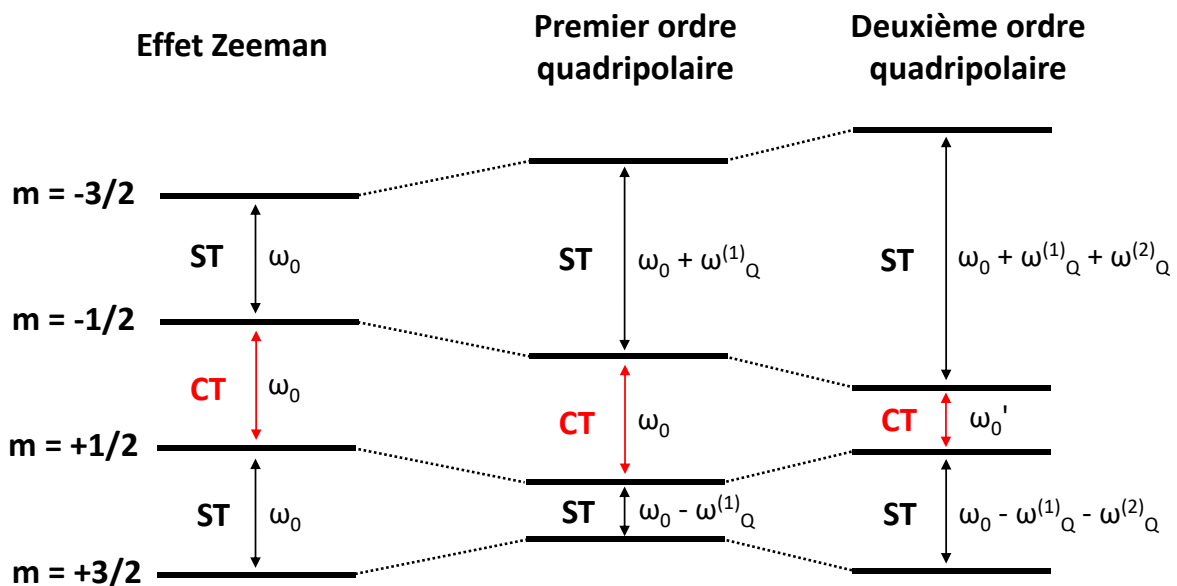


Figure 27 : Effet de l'interaction quadripolaire au premier ordre et au second ordre sur l'effet Zeeman.

A fréquence de rotation nulle, le premier ordre quadripolaire se traduit ainsi par un signal central fin et intense correspondant à la transition centrale, entouré de signaux larges symétriques, les transitions satellites. La rotation à l'angle magique permet de moyenniser le premier ordre, bien que les fréquences de rotation soient généralement inférieures à la constante quadripolaire C_Q . Ainsi, le premier ordre subsiste sous la forme de bandes de rotation. Cela s'explique par la dépendance en $3\cos^2\theta - 1$ du premier ordre quadripolaire. Ce principe est illustré en Figure 28.

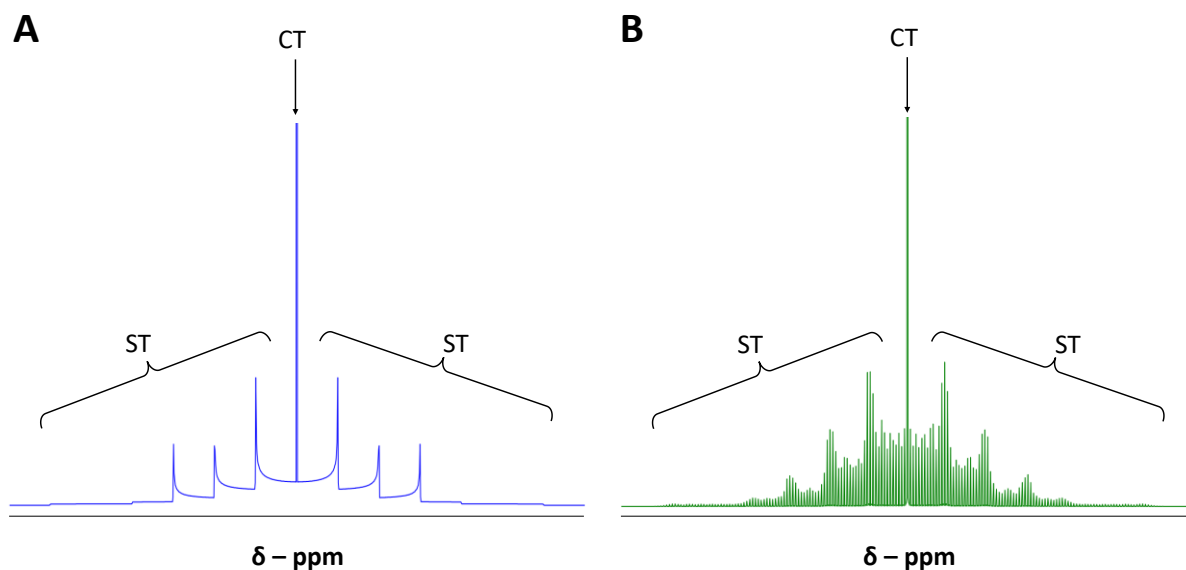


Figure 28 : Effet de la rotation à l'angle magique sur le premier ordre quadripolaire. (A) $v_{\text{ROT}} = 0$ Hz, (B) $v_{\text{ROT}} = 10$ kHz. Simulation pour un spin $\frac{7}{2}$ avec un $C_Q = 8$ MHz.

Ce n'est malheureusement pas le cas du second ordre quadripolaire. Son expression suit un polynôme de Legendre de degré 4 ne pouvant pas être annulé en même temps que le premier ordre à l'angle magique. Toutefois, l'angle magique permet tout de même de limiter son expression. Il s'en suit un élargissement de la transition centrale (et des transitions satellites). Nous pouvons observer la forme typique d'un élargissement de la transition centrale par le second ordre quadripolaire selon le paramètre d'asymétrie η_Q à fréquence de rotation nulle (Figure 29A, Figure 29B) et à 100 kHz (Figure 29C, Figure 29D). La CT ne peut plus être définie comme un signal lorentzien/gaussien. Nous tenons par ailleurs à faire remarquer que le déplacement chimique isotrope ne se trouve pas nécessairement au centre du signal, mais légèrement sur sa gauche. Notons que la rotation parvient à réduire légèrement la largeur de la transition centrale, mais cet effet sera limité, même à fréquence de rotation infinie.

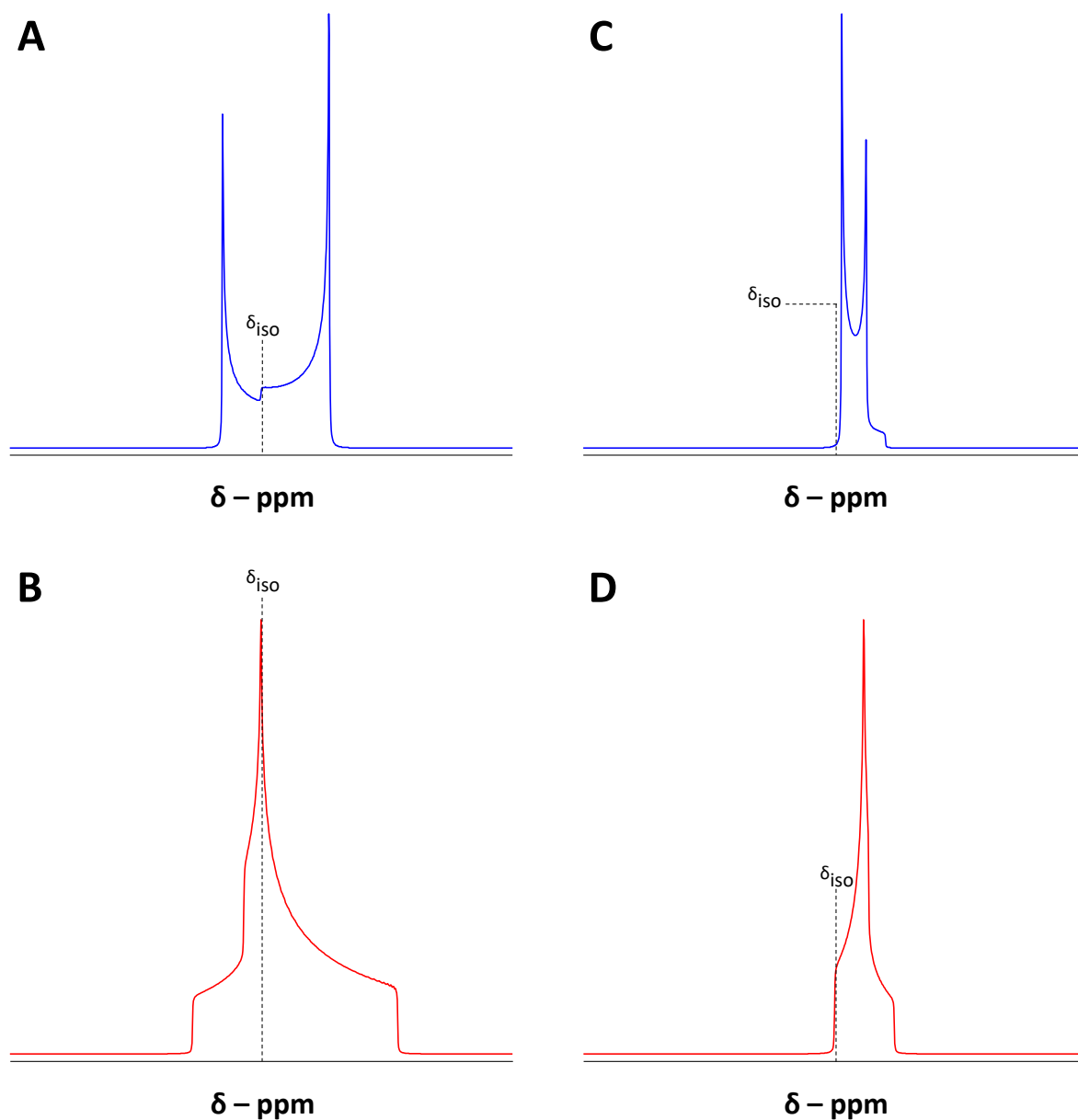


Figure 29 : Forme typique d'un signal sujet à l'interaction quadripolaire au second ordre pour un paramètre d'asymétrie (A) $\eta = 0$ et (B) $\eta = 1$ à fréquence de rotation nulle et à en rotation à l'angle magique (C) $\eta = 0$ et (D) $\eta = 1$.

Au-delà de la fréquence de rotation, l'utilisation de champs magnétiques de plus en plus élevés demeure une solution prometteuse. En effet, plus le champ magnétique B_0 est élevé, plus l'effet Zeeman augmente et plus le quadripolaire au second ordre est faible en comparaison. Cela permet de moyenniser partiellement l'interaction quadripolaire. Pour s'affranchir totalement de l'interaction au second ordre, les méthodes DOR (DOuble Rotation)⁵⁰ et DAS (Dynamic Angle Spinning)⁵¹ introduisent un deuxième axe de rotation permettant d'obtenir des spectres haute résolution. Néanmoins, ces techniques souffrent de quelques limitations instrumentales (sondes de grande complexité, faibles fréquences de rotation) et les expériences dépendent de la relaxation de l'échantillon. Plus tard, Frydman et Harwood ont développé une méthode plus versatile et moins contraignante, l'expérience MQMAS (Multi-Quanta MAS)^{52,53}. Cette dernière s'appuie sur la manipulation des transitions multiple-quantum pour moyenniser l'interaction quadripolaire au second ordre. Dans les cas les plus extrêmes,

c'est-à-dire dans le cas d'interactions quadripolaires si élevées qu'elles ne peuvent être moyennées par aucune de ces approches, il vaut mieux se tourner vers d'autres méthodes telles que la résonance quadripolaire nucléaire^{54,55}.

Comme décrit précédemment, l'interaction quadripolaire au second ordre affecte à la fois la transition centrale (et les transitions satellites). Il en résulte qu'un noyau quadripolaire ne peut pas être manié comme un spin $\frac{1}{2}$ car la transition centrale dépend de l'interaction dipolaire et donc de l'échantillon. Il existe quelques exceptions, par exemple si l'échantillon adopte un haut niveau de symétrie, telle qu'une symétrie cubique, ou que la dynamique du système moyenne l'interaction quadripolaire, typiquement une solution. Dans ces rares cas, le tenseur de gradient de champ électrique est nul, donc les paramètres quadripolaires sont nuls et le noyau se comporte comme un spin $\frac{1}{2}$. En pratique, nous pouvons décrire 2 types de régimes :

- Le régime est dit « non sélectif » lorsque la fréquence de l'impulsion RF est grande devant la fréquence quadripolaire. On excite alors l'ensemble des transitions satellites et de la transition central.
- A l'inverse, si le champ RF de l'impulsion est petite devant l'interaction quadripolaire, on se trouve dans le régime sélectif ou linéaire. Dans ce régime de fréquence, tous les spins couplés à l'interaction quadripolaire se comportent de la même manière et il est alors possible d'obtenir un spectre quantitatif.

Outre la difficulté d'exciter sélectivement la transition centrale, le champ de gradient électrique représente une source de relaxation pour les noyaux quadripolaires. Si cela présente un avantage pour les acquisitions directes composées d'une seule impulsion, ce n'est pas le cas pour des séquences d'impulsion plus complexes nécessitant de manier les spins. La conséquence directe d'une relaxation rapide peut être illustrée par l'expérience de polarisation croisée sur des noyaux quadripolaires. En effet, la relaxation longitudinale dans le repère tournant $T_{1\rho}$ peut être rapide et compliquer l'étape du spinlock⁵⁶. La polarisation croisée reste possible dans des gammes étroites de puissance satisfaisant une condition de Hartmann-Hahn modifiée : $\omega_{1I} = (S + \frac{1}{2})\omega_{1S} \pm n\omega_R$, où I est le spin abondant (typiquement ^1H), S le noyau quadripolaire, n un entier et ω_R la fréquence de rotation⁵⁷. Les puissances peuvent parfois être trop faibles, il en résulte que la polarisation croisée n'est pas si populaire dans le cas des noyaux quadripolaires.

Pour conclure cette partie, nous prenons l'exemple du ^{43}Ca qui fera l'objet de développements méthodologiques dans le cadre de cette thèse. Ce dernier possède un rapport gyromagnétique relativement faible ($-1,8.10^7 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$) et une faible abondance naturelle (0,135%)⁵⁸. Il est le parfait exemple d'un noyau intrinsèquement peu sensible rendant sa caractérisation systématique complexe. Pour couronner le tout, il s'agit d'un noyau quadripolaire possédant un nombre de spins $\frac{7}{2}$. Pour contrebalancer la faible sensibilité du ^{43}Ca , plusieurs stratégies ont pu être employées :

- L'utilisation de rotors de grand volume permettant d'analyser de grandes quantités de poudres permettant l'acquisition de spectres ^{43}Ca satisfaisants en moins d'une journée⁵⁹⁻⁶¹
- L'enrichissement isotopique en ^{43}Ca à partir de $^{43}\text{CaCO}_3$ comme réactif de départ. Cette approche permet notamment de réaliser des expériences poussées telles que des expériences bidimensionnelles (MQ-MAS, TRAPDOR) en un temps record⁶²⁻⁶⁴.

- L'utilisation de hauts champs magnétiques permettant de réduire l'interaction quadripolaire au second ordre et d'augmenter la sensibilité des noyaux ayant un faible rapport gyromagnétique^{65,66}.
- Le développement de séquences d'impulsion permettant d'inverser la population des transitions satellites et de la transition centrale, telles que le DFS (Double Frequency Sweep)⁶⁷ ou la sécante hyperbolique⁶⁸. Cette approche permet d'enregistrer un spectre ⁴³Ca satisfaisant en quelques jours en utilisant une sonde de 4 mm^{69,70}.
- La polarisation dynamique nucléaire (DNP) exploitant le transfert de la polarisation des électrons vers les noyaux d'intérêt. Ce principe sera décrit plus en profondeur dans la partie suivante. Cette approche a notamment permis d'enregistrer une expérience bidimensionnelle Hetcor ¹H—⁴³Ca en abondance naturelle⁷¹.

Ainsi, ces 20 dernières années, la RMN du ⁴³Ca a profité de nombreux développements méthodologiques permettant d'exploiter plus en profondeur cette spectroscopie. Il en découle que les constantes quadripolaires sont généralement inférieures à 4 MHz^{72,73}. La combinaison de la RMN ⁴³Ca avec des approches computationnelles a permis de populariser la cristallographie RMN⁷⁴. Ces dernières ont notamment permis d'établir des corrélations entre déplacement chimique ⁴³Ca et les longueurs de liaison Ca—O ainsi que la coordinence des atomes de calcium⁷⁵.

Néanmoins, s'il est possible d'obtenir des spectres ⁴³Ca de poudres en suivant ces approches, rien ne garantit que la détection du ⁴³Ca dans les espèces de prénucléation, espèces solubles fortement moins concentrées que des solides, soit possible. Parmi les approches présentées, l'enrichissement isotopique et la DNP s'avère être les solutions les plus prometteuses.

IV. La RMN hyperpolarisée par DNP

La DNP est une catégorie de la RMN hyperpolarisée regroupant l'ensemble des techniques RMN permettant d'augmenter la sensibilité sur la base d'une augmentation de la polarisation. Parmi celles-ci, nous pouvons citer l'hyperpolarisation du xénon par pompage optique⁷⁶, l'hyperpolarisation parahydrogène⁷⁷ et la polarisation dynamique nucléaire (DNP). La DNP comprend elle-même plusieurs approches telles que la MAS-DNP^{78,79} s'appliquant à la RMN à l'état solide, la Dissolution-DNP s'appliquant à la RMN en solution⁸⁰, mais aussi la DNP induite par photochimie⁸¹ ou encore la polarisation optique de centre azote-lacune dans les diamants⁸².

La théorie de la RMN hyperpolarisée par DNP (Dynamic Nuclear polarisation) a premièrement été proposée par Overhauser⁸³ en 1953. Cette théorie s'appuie sur le transfert de la polarisation des électrons non appariés (radicaux) par la saturation de la raie de résonance paramagnétique produite par des irradiations micro-ondes aux noyaux environnants I, le transfert étant maximisé à basse température. Le gain théorique ϵ d'un tel transfert est défini par le rapport des rapports gyromagnétiques respectifs $\epsilon = \frac{\gamma_e}{\gamma_I}$. Il existe différents mécanismes de transfert basés sur une irradiation micro-onde :

- L'effet Overhauser concerne le transfert de polarisation entre les électrons de la bande de conduction d'un métal et les noyaux métalliques à proximité dans un solide ou dans une

solution⁸³. L'hyperpolarisation nucléaire résulte de la relaxation paramagnétique provoquée par l'interaction hyperfine entre les électrons et les noyaux.

- Le « Solid-effect » ou effet solide considère l'interaction d'un électron e et d'un noyau I dans des conditions spécifiques de résonance paramagnétique électronique (RPE). En particulier, ce mécanisme est dominant lorsque la transition RPE d'un radical est faible devant la fréquence de Larmor du noyau à proximité. Pour que le transfert ait lieu, l'irradiation micro-onde doit exciter les transitions 0Q et 2Q telles que $\nu_0(e) \pm \nu_0(I)$. Sous l'effet de la rotation à l'angle magique, ces transitions ne sont plus discrètes et l'irradiation n'est pas continue⁸⁴.
- Le « Cross-effect » considère 2 électrons e_1 et e_2 couplés (par interaction dipolaire ou couplage scalaire direct J) et un noyau I . La transition RPE d'au moins un des électrons doit être largement supérieure à la fréquence de Larmor du noyau I . La rotation à l'angle magique peut créer des différences de population électroniques entre e_1 et e_2 responsables d'une forte polarisation électronique pouvant être transférées au noyau I si l'irradiation micro-onde satisfait $|\nu_0(e_1) - \nu_0(e_2)| = |\nu_0(I)|$ ⁸⁵. Il s'agit du mécanisme de transfert prépondérant à hauts champs magnétiques et vitesses de rotation, soit le plus utilisé dans les expériences MAS-DNP de nos jours.
- Le Thermal mixing ou mélange thermique nécessite un bain d'électrons fortement couplés entre eux présentant une transition RPE homogène et large⁸⁶, ce qui n'est pas nécessairement le cas sous l'effet de la rotation à l'angle magique. De plus, ce mécanisme n'est observé qu'à très faibles températures ($T \leq 4K$), il n'intervient donc généralement pas dans les expériences de MAS-DNP.

Historiquement, l'effet Overhauser a ensuite été vérifié par Carver et Slichter sur du lithium métallique⁸⁷ en conditions statiques avec un très faible champ magnétique. Il faudra attendre 1983 pour observer la première expérience MAS-DNP en rotation à l'angle magique⁸⁸ et les années 1990 pour que la MAS-DNP soit démocratisée à des champs magnétiques supérieurs à 5 T. Grâce au développement de sources micro-ondes suffisamment puissantes (gyrotrons)⁸⁹, au design de sondes cryogéniques⁹⁰ et de biradicaux (source d'électrons favorisant le cross-effect)⁹¹, Griffin a fortement contribué à la popularisation de la MAS-DNP qui n'a pas cessé d'évoluer depuis. Si les contributions précédant la disponibilité commerciale d'un spectromètre MAS-DNP en 2010 s'intéressent à des preuves de concepts et des développements méthodologiques et instrumentaux, l'application de la MAS-DNP a pu se préciser par la suite avec un nombre grandissant de publications par année (Figure 30).

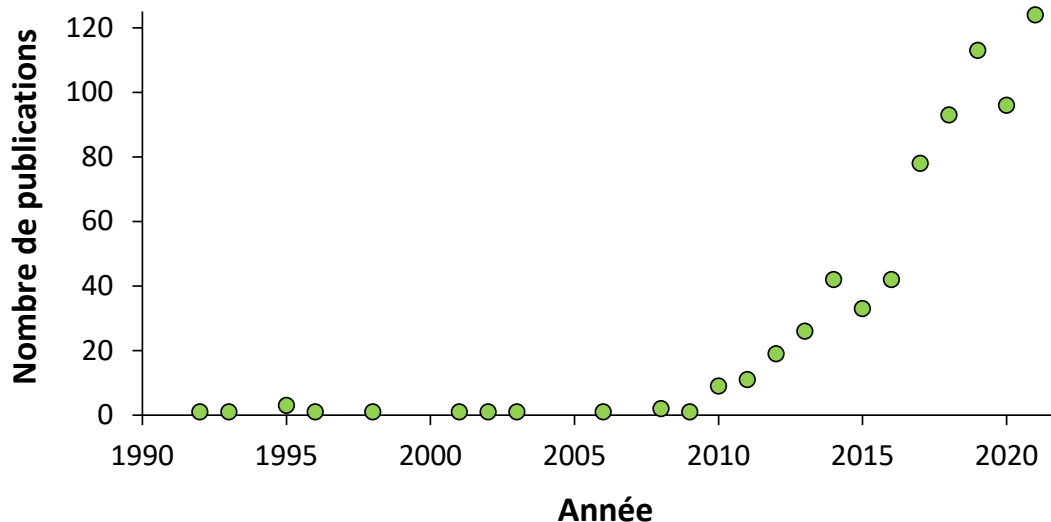


Figure 30 : Nombre de publications (articles, revues, ouvrages) dédiées à la MAS-DNP depuis les années 1990. Résultats issus de la recherche du mot-clé « MAS-DNP » sur le moteur de recherche Google Scholar.

L'approche consiste généralement à transférer une première fois la polarisation électroniques aux protons environnants abondants, puis d'effectuer une étape de polarisation croisée vers le noyau d'intérêt, bien que ce ne soit pas toujours le cas⁹². Les gains en sensibilité sont substantiels, permettant d'appliquer cette technique à beaucoup d'échantillons peu sensibles. Parmi ceux-là, nous pouvons citer l'usage de la DNP pour la caractérisation de composés d'intérêts biologiques telles que les protéines^{93,94}, de composés intrinsèquement peu sensibles, contenant par exemple du ¹⁷O⁹⁵. Nous rappelons que le cross-effect est le principal mécanisme de transfert de polarisation exploité dans la MAS-DNP de notre époque. L'efficacité de ce dernier est limitée aux interfaces se traduisant par une augmentation drastique de la sensibilité aux composantes surfaciques et interfaciales de composés. La MAS-DNP ou DNP-SENS (Surface ENhanced Spectroscopy)⁹⁶ peut donc aussi être utilisée pour sonder les réactions aux interfaces de matériaux catalytiques⁹⁷ ou les interfaces organo-minérales⁹⁸. Enfin, les températures cryogéniques de travail permettent par ailleurs de caractériser des espèces transitoires piégées cinétiquement^{99,100}. Comme nous venons de l'illustrer, la MAS-DNP de notre époque permet de répondre efficacement à un panel diversifié de problématiques. Pour aller encore plus loin, les tendances actuelles de développements méthodologiques et instrumentaux de la MAS-DNP concernent (liste non exhaustive) :

- L'usage de températures de plus en plus faibles, typiquement en dessous de 30K en exploitant la température de l'hélium liquide plutôt que l'azote liquide^{101,102}
- L'usage de champs magnétiques plus élevés^{103,104}
- La DNP « haute-température » (supérieure à 100K)¹⁰⁵
- Les approches permettant de se passer de l'obligation d'utiliser une matrice vitreuse^{106,107}
- L'hyperpolarisation sélective de molécules en particulier¹⁰⁸ ou au cœur du matériau¹⁰⁹
- Le design de radicaux plus en plus efficaces¹¹⁰

D'un point de vue pratique, les mécanismes de transfert de polarisation et *a fortiori* les gains de sensibilité sont fortement dépendants de la préparation de l'échantillon. Tout d'abord, les choix du radical et du solvant sont cruciaux, car le radical doit être soluble dans le solvant. Dans le cadre de ce

manuscrit et comme toutes nos expériences étaient réalisées dans l'eau, nous avons conservé l'eau comme solvant en utilisant les radicaux AMUPol et Tinypol, ceux-ci étant plus efficaces respectivement à bas et hauts champs magnétiques¹¹¹. Comme les températures de travail en DNP sont de 100K et qu'il faut que le radical soit distribué de manière homogène pour polariser efficacement l'échantillon, il faut s'assurer de former une matrice vitreuse dans le but d'éviter la réprécipitation et la ségrégation de phase formées par des cristaux de glace. Il est donc d'usage d'ajouter un agent dit « cryoprotectant » tel que le glycérol ou le DMSO dont les proportions ont été optimisées par le passé^{112,113}. Enfin, nous notons que la dilution de la quantité de protons, par l'ajout de D₂O par exemple, conduit généralement à de meilleurs gains en sensibilité^{114,115}.

Nous concluons cette partie sur les avantages et inconvénients de la MAS-DNP appliqués à notre système d'étude. Tout d'abord, le gain substantiel en sensibilité conféré par l'hyperpolarisation est essentiel, car les concentrations ioniques utilisées dans nos solutions minéralisantes est aux alentours de 10⁻³ M, ce qui est très faible en comparaison à la « concentration » dans les solides (10⁰–10¹ M). Cette différence de 10³–10⁴ en concentration implique que, pour un même temps d'acquisition, nous obtiendrions un SNR 10³ à 10⁴ fois plus faible, soit qu'il nécessiterait 10⁶ à 10⁸ fois plus de temps pour obtenir un spectre à SNR identique. Deuxièmement, les températures cryogéniques de travail seront exploitées pour stopper la réaction de minéralisation à des moments bien définis pour caractériser la structure des différentes espèces transitoires.

Les inconvénients majeurs de la MAS-DNP sur les mécanismes de nucléation proviennent principalement des additifs utilisés dans la préparation de l'échantillon. Concrètement, il faut s'assurer que l'agent cryoprotectant et le radical n'interviennent pas dans les mécanismes de la minéralisation ou sur des modifications de morphologie de la phase formée. L'interaction potentielle d'un radical avec le noyau d'intérêt peut notamment être détecté par un effondrement de l'intensité des signaux induit par des effets paramagnétiques du radical¹¹⁶. L'interaction avec l'agent cryoprotectant a plus de chances d'être considérée du fait de ses hautes proportions dans la solution. Cela justifie notamment les axes de recherche actuels visant à réduire de plus en plus l'utilisation de ce type d'agents. Nous pouvons par exemple citer les travaux de Vioglio *et al.* s'intéressant à la cristallisation de la glycine. Dans cette étude, la quantité de glycérol a été limitée à 5% et des essais sans glycérol ont aussi été étudiés de manière à discriminer son effet dans la cristallisation⁹⁹. Enfin, l'effet conjoint de la deutération et de l'ajout du glycérol peuvent aussi remettre en question la notion de pH. De notre côté, nous avons réalisé nos expériences à 20% de glycérol en s'assurant que le mécanisme de minéralisation restait identique en termes de cinétiques et de nombre d'étapes par potentiométrie calcium dans ces conditions.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les concepts majeurs de la RMN nécessaires à la compréhension des résultats exposés dans ce manuscrit. Il apparaît clairement que cette technique est très puissante car elle permet d'accéder à des informations structurales et dynamiques qui ne sont pas détectables avec d'autres techniques. La quantitatativité, la résolution temporelle, les interactions dipolaires, le déplacement chimique et son anisotropie représentent autant d'axes qui seront exploités dans le cadre de travail doctoral.

D'autre part, le point bloquant de la RMN concerne bien souvent la sensibilité de cette technique. Dans ce manuscrit, nous utiliserons plusieurs stratégies permettant d'augmenter cette sensibilité, telles que l'enrichissement isotopique, l'utilisation de cryosondes en solution ou encore la polarisation dynamique nucléaire à l'état solide.

En particulier, les spectres en solution exposés dans les chapitres III à VI ont été obtenus à partir d'une crysonde s'accordant au noyau ^{31}P et ont été réalisés en collaboration avec Dennis Kurzbach, Professeur associé à l'Université de Vienne.

D'autre part, la MAS-DNP a été utilisée pour caractériser différentes espèces transitoires, qu'elles soient solubles ou solides dans les chapitres V à VII. En effet, les températures cryogéniques de travail ont permis de vitrifier des solutions à des moments bien définis. De plus, le gain en sensibilité conféré par l'hyperpolarisation a permis de sonder des échantillons faiblement concentrés (\approx mM) en des temps raisonnables, typiquement de la minute à la journée. Les avantages et inconvénients de cette technique seront détaillés dans les prochains chapitres.

Références bibliographiques

- (1) Rabi, I. I.; Zacharias, J. R.; Millman, S.; Kusch, P. A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment. *Phys. Rev.* **1938**, *53* (4), 318–318. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.53.318>.
- (2) Bloch, F. Nuclear Induction. *Phys. Rev.* **1946**, *70* (7–8), 460–474. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.70.460>.
- (3) Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys. Rev.* **1946**, *69* (1–2), 37–38. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.69.37>.
- (4) Keeler, J. *Understanding NMR Spectroscopy / James Keeler.*; Wiley, 2005.
- (5) Canet, D.; Boubel, J.-C.; Canet-Soulas, E. *La RMN: concepts, méthodes et applications*; Dunod: Paris, France, 2002.
- (6) Levitt, M. H. *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*; John Wiley & Sons, 2013.
- (7) Abragam, A. *The Principles of Nuclear Magnetism*; Clarendon Press, 1961.
- (8) Puiseux, T.; Sewonu, A.; Moreno, R.; Mendez, S.; Nicoud, F. Numerical Simulation of Time-Resolved 3D Phase-Contrast Magnetic Resonance Imaging. *PLOS ONE* **2021**, *16* (3), e0248816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248816>.
- (9) Mehring, M. *Principles of High Resolution NMR in Solids*; Springer: Berlin, Heidelberg, 1983. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-68756-3>.
- (10) Brutscher, B.; Solyom, Z. Chapter 1 Polarization-Enhanced Fast-Pulsing Techniques. **2017**, 1–32. <https://doi.org/10.1039/9781782628361-00001>.
- (11) Bernstein, H. J.; Pople, J. A.; Schneider, W. G. The Analysis of Nuclear Magnetic Resonance Spectra: I. Systems of Two and Three Nuclei. *Can. J. Chem.* **1957**, *35* (1), 67–83. <https://doi.org/10.1139/v57-011>.
- (12) Saito, T.; Nakaie, S.; Kinoshita, M.; Ihara, T.; Kinugasa, S.; Nomura, A.; Maeda, T. Practical Guide for Accurate Quantitative Solution State NMR Analysis. *Metrologia* **2004**, *41* (3), 213. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/41/3/015>.
- (13) Kim, H. C.; Ko, Y.-J.; Kim, M.; Choe, J.; Yong, H. I.; Jo, C. Optimization of 1D ¹H Quantitative NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Conditions for Polar Metabolites in Meat. *Food Sci. Anim. Resour.* **2019**, *39* (1), 1–12. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e54>.
- (14) Losonczi, J.; Kupce, E.; Gray, G.; Sandor, P.; Brutscher, B. Aligning Ultrafast NMR Spectroscopy and Cold Probe Technology to Reveal the Mysteries of Protein Dynamics. *Am. Lab.* **2006**, *38*, 23-25+14.
- (15) Giraudeau, P.; Silvestre, V.; Akoka, S. Optimizing Water Suppression for Quantitative NMR-Based Metabolomics: A Tutorial Review. *Metabolomics* **2015**, *11* (5), 1041–1055. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0794-7>.
- (16) Wüthrich, K.; Wagner, G. Nuclear Magnetic Resonance of Labile Protons in the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor. *J. Mol. Biol.* **1979**, *130* (1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(79\)90548-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90548-5).
- (17) Kleckner, I. R.; Foster, M. P. An Introduction to NMR-Based Approaches for Measuring Protein Dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1814* (8), 942–968. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.10.012>.

- (18) Andersson, T.; Drakenberg, T.; Forsen, S.; Thulin, E.; Swaerd, M. Direct Observation of the Calcium-43 NMR Signals from Calcium(2+) Bound to Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104* (2), 576–580. <https://doi.org/10.1021/ja00366a035>.
- (19) Becker, W.; Bhattiprolu, K. C.; Gubensäk, N.; Zangger, K. Investigating Protein–Ligand Interactions by Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemphyschem* **2018**, *19* (8), 895–906. <https://doi.org/10.1002/cphc.201701253>.
- (20) Gerotheranassis, I. P.; Troganis, A.; Exarchou, V.; Barbarossou, K. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) SPECTROSCOPY: BASIC PRINCIPLES AND PHENOMENA, AND THEIR APPLICATIONS TO CHEMISTRY, BIOLOGY AND MEDICINE. *Chem. Educ. Res. Pract.* **2002**, *3* (2), 229–252. <https://doi.org/10.1039/B2RP90018A>.
- (21) Duer, M. J. *Solid State NMR Spectroscopy: Principles and Applications*; John Wiley & Sons, 2001.
- (22) Andrew, E. R.; Bradbury, A.; Eades, R. G. Removal of Dipolar Broadening of Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Solids by Specimen Rotation. *Nature* **1959**, *183* (4678), 1802–1803. <https://doi.org/10.1038/1831802a0>.
- (23) Lowe, I. J. Free Induction Decays of Rotating Solids. *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2* (7), 285–287. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.2.285>.
- (24) Sternberg, U.; Witter, R.; Kuprov, I.; Lamley, J. M.; Oss, A.; Lewandowski, J. R.; Samoson, A. 1H Line Width Dependence on MAS Speed in Solid State NMR – Comparison of Experiment and Simulation. *J. Magn. Reson.* **2018**, *291*, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2018.04.003>.
- (25) Haeberlen, U. *High Resolution NMR in Solids Selective Averaging: Supplement 1 Advances in Magnetic Resonance*; Elsevier, 2012.
- (26) Turner, G. L.; Smith, K. A.; Kirkpatrick, R. J.; Oldfieldt, E. Structure and Cation Effects on Phosphorus-31 NMR Chemical Shifts and Chemical-Shift Anisotropies of Orthophosphates. *J. Magn. Reson.* **1969** *1986*, *70* (3), 408–415. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(86\)90129-0](https://doi.org/10.1016/0022-2364(86)90129-0).
- (27) Pake, G. E. Nuclear Resonance Absorption in Hydrated Crystals: Fine Structure of the Proton Line. *J. Chem. Phys.* **1948**, *16* (4), 327–336. <https://doi.org/10.1063/1.1746878>.
- (28) Fung, B. M.; Khitrin, A. K.; Ermolaev, K. An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **2000**, *142* (1), 97–101. <https://doi.org/10.1006/jmre.1999.1896>.
- (29) Bräuniger, T.; Wormald, P.; Hodgkinson, P. Improved Proton Decoupling in NMR Spectroscopy of Crystalline Solids Using the S PINAL -64 Sequence. *Monatshefte Fr Chem. Chem. Mon.* **2002**, *133* (12), 1549–1554. <https://doi.org/10.1007/s00706-002-0501-z>.
- (30) Hartmann, S. R.; Hahn, E. L. Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame. *Phys. Rev.* **1962**, *128* (5), 2042–2053. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.128.2042>.
- (31) Redfield, A. G. Nuclear Magnetic Resonance Saturation and Rotary Saturation in Solids. *Phys. Rev.* **1955**, *98* (6), 1787–1809. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.98.1787>.
- (32) Pines, A.; Gibby, M. G.; Waugh, J. S. Proton-enhanced NMR of Dilute Spins in Solids. *J. Chem. Phys.* **1973**, *59* (2), 569–590. <https://doi.org/10.1063/1.1680061>.
- (33) Sakellariou, D.; Lesage, A.; Hodgkinson, P.; Emsley, L. Homonuclear Dipolar Decoupling in Solid-State NMR Using Continuous Phase Modulation. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *319* (3), 253–260. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(00\)00127-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(00)00127-5).
- (34) Lee, M.; Goldberg, W. I. Nuclear-Magnetic-Resonance Line Narrowing by a Rotating Rf Field. *Phys. Rev.* **1965**, *140* (4A), A1261–A1271. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.140.A1261>.

- (35) Halse, M. E.; Emsley, L. A Common Theory for Phase-Modulated Homonuclear Decoupling in Solid-State NMR. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (25), 9121–9130. <https://doi.org/10.1039/C2CP40720E>.
- (36) Szeverenyi, N. M.; Sullivan, M. J.; Maciel, G. E. Observation of Spin Exchange by Two-Dimensional Fourier Transform ¹³C Cross Polarization-Magic-Angle Spinning. *J. Magn. Reson.* **1969** *1982*, *47* (3), 462–475. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(82\)90213-X](https://doi.org/10.1016/0022-2364(82)90213-X).
- (37) Takegoshi, K.; Nakamura, S.; Terao, T. ¹³C–¹H Dipolar-Assisted Rotational Resonance in Magic-Angle Spinning NMR. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *344* (5), 631–637. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(01\)00791-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(01)00791-6).
- (38) Dusold, S.; Sebald, A. Dipolar Recoupling under Magic-Angle Spinning Conditions. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Academic Press, 2000; Vol. 41, pp 185–264. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(00\)41010-0](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(00)41010-0).
- (39) Bennett, A. E.; Griffin, R. G.; Vega, S. Recoupling of Homo- and Heteronuclear Dipolar Interactions in Rotating Solids. In *Solid-State NMR IV Methods and Applications of Solid-State NMR*; Blümich, B., Ed.; NMR Basic Principles and Progress; Springer: Berlin, Heidelberg, 1994; pp 1–77. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79127-7_1.
- (40) Levitt, M. H. Symmetry-Based Pulse Sequences in Magic-Angle Spinning Solid-State NMR; Grant, D. M., Harris, R. K., Eds.; Wiley, 2002; pp 165–196.
- (41) Hohwy, M.; Rienstra, C. M.; Jaroniec, C. P.; Griffin, R. G. Fivefold Symmetric Homonuclear Dipolar Recoupling in Rotating Solids: Application to Double Quantum Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110* (16), 7983–7992. <https://doi.org/10.1063/1.478702>.
- (42) Hohwy, M.; Jakobsen, H. J.; Edén, M.; Levitt, M. H.; Nielsen, N. C. Broadband Dipolar Recoupling in the Nuclear Magnetic Resonance of Rotating Solids: A Compensated C7 Pulse Sequence. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108* (7), 2686–2694. <https://doi.org/10.1063/1.475661>.
- (43) Brinkmann, A.; Edén, M.; Levitt, M. H. Synchronous Helical Pulse Sequences in Magic-Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance: Double Quantum Recoupling of Multiple-Spin Systems. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112* (19), 8539–8554. <https://doi.org/10.1063/1.481458>.
- (44) Baccile, N.; Laurent, G.; Bonhomme, C.; Innocenzi, P.; Babonneau, F. Solid-State NMR Characterization of the Surfactant–Silica Interface in Templated Silicas: Acidic versus Basic Conditions. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (6), 1343–1354. <https://doi.org/10.1021/cm062545j>.
- (45) Von Euw, S.; Ajili, W.; Chan-Chang, T.-H.-C.; Delices, A.; Laurent, G.; Babonneau, F.; Nassif, N.; Azaïs, T. Amorphous Surface Layer versus Transient Amorphous Precursor Phase in Bone – A Case Study Investigated by Solid-State NMR Spectroscopy. *Acta Biomater.* **2017**, *59*, 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.040>.
- (46) Gullion, T.; Schaefer, J. Rotational-Echo Double-Resonance NMR. *J. Magn. Reson.* **1969** *1989*, *81* (1), 196–200. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(89\)90280-1](https://doi.org/10.1016/0022-2364(89)90280-1).
- (47) Mueller, K. T. Analytic Solutions for the Time Evolution of Dipolar-Dephasing NMR Signals. *J. Magn. Reson. A* **1995**, *113* (1), 81–93. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1059>.
- (48) Gullion, T.; Baker, D. B.; Conradi, M. S. New, Compensated Carr-Purcell Sequences. *J. Magn. Reson.* **1969** *1990*, *89* (3), 479–484. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(90\)90331-3](https://doi.org/10.1016/0022-2364(90)90331-3).
- (49) Widdifield, C. M.; Bryce, D. L. Solid-State ¹²⁷I NMR and GIPAW DFT Study of Metal Iodides and Their Hydrates: Structure, Symmetry, and Higher-Order Quadrupole-Induced Effects. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114* (40), 10810–10823. <https://doi.org/10.1021/jp108237x>.
- (50) Samoson, A.; Lippmaa, E.; Pines, A. High Resolution Solid-State N.M.R. *Mol. Phys.* **1988**, *65* (4), 1013–1018. <https://doi.org/10.1080/00268978800101571>.

- (51) Llor, A.; Virlet, J. Towards High-Resolution NMR of More Nuclei in Solids: Sample Spinning with Time-Dependent Spinner Axis Angle. *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *152* (2), 248–253. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(88\)87362-7](https://doi.org/10.1016/0009-2614(88)87362-7).
- (52) Frydman, L.; Harwood, J. S. Isotropic Spectra of Half-Integer Quadrupolar Spins from Bidimensional Magic-Angle Spinning NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (19), 5367–5368. <https://doi.org/10.1021/ja00124a023>.
- (53) Medek, A.; Harwood, J. S.; Frydman, L. Multiple-Quantum Magic-Angle Spinning NMR: A New Method for the Study of Quadrupolar Nuclei in Solids. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (51), 12779–12787. <https://doi.org/10.1021/ja00156a015>.
- (54) Leroy, C.; Johannson, R.; Bryce, D. L. 121/123Sb Nuclear Quadrupole Resonance Spectroscopy: Characterization of Non-Covalent Pnictogen Bonds and NQR Crystallography. *J. Phys. Chem. A* **2019**, *123* (5), 1030–1043. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.8b11490>.
- (55) Widdifield, C. M.; Jurca, T.; Richeson, D. S.; Bryce, D. L. Using 69/71Ga Solid-State NMR and 127I NQR as Probes to Elucidate the Composition of “Gal.” *Polyhedron* **2012**, *35* (1), 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2012.01.003>.
- (56) Vega, A. J. MAS NMR Spin Locking of Half-Integer Quadrupolar Nuclei. *J. Magn. Reson.* **1969** *1992*, *96* (1), 50–68. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(92\)90287-H](https://doi.org/10.1016/0022-2364(92)90287-H).
- (57) Vega, A. J. CPMAS of Quadrupolar S = 32 Nuclei. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **1992**, *1* (1), 17–32. [https://doi.org/10.1016/0926-2040\(92\)90006-U](https://doi.org/10.1016/0926-2040(92)90006-U).
- (58) Harris, R. K.; Becker, E. D.; Menezes, S. M. C. de; Goodfellow, R.; Granger, P. NMR Nomenclature. Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73* (11), 1795–1818. <https://doi.org/10.1351/pac200173111795>.
- (59) Dupree, R.; Howes, A. P.; Kohn, S. C. Natural Abundance Solid State 43Ca NMR. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *276* (5), 399–404. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(97\)00863-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)00863-4).
- (60) Lin, Z.; Smith, M. E.; Sowrey, F. E.; Newport, R. J. Probing the Local Structural Environment of Calcium by Natural-Abundance Solid-State ^{43}Ca NMR. *Phys. Rev. B* **2004**, *69* (22), 224107. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.69.224107>.
- (61) Bryce, D. L.; Bultz, E. B.; Aebi, D. Calcium-43 Chemical Shift Tensors as Probes of Calcium Binding Environments. Insight into the Structure of the Vaterite CaCO_3 Polymorph by ^{43}Ca Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (29), 9282–9292. <https://doi.org/10.1021/ja8017253>.
- (62) Laurencin, D.; Wong, A.; Dupree, R.; Smith, M. E. Natural Abundance 43Ca Solid-State NMR Characterisation of Hydroxyapatite: Identification of the Two Calcium Sites. *Magn. Reson. Chem. MRC* **2008**, *46* (4), 347–350. <https://doi.org/10.1002/mrc.2117>.
- (63) Laurencin, D.; Gervais, C.; Wong, A.; Coelho, C.; Mauri, F.; Massiot, D.; Smith, M. E.; Bonhomme, C. Implementation of High Resolution 43Ca Solid State NMR Spectroscopy: Toward the Elucidation of Calcium Sites in Biological Materials. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (37), 13430–13440. <https://doi.org/10.1021/ja904553q>.
- (64) Laurencin, D.; Li, Y.; Duer, M. J.; Iuga, D.; Gervais, C.; Bonhomme, C. A 43Ca Nuclear Magnetic Resonance Perspective on Octacalcium Phosphate and Its Hybrid Derivatives. *Magn. Reson. Chem. MRC* **2021**, *59* (9–10), 1048–1061. <https://doi.org/10.1002/mrc.5149>.
- (65) Bonhomme, C.; Wang, X.; Hung, I.; Gan, Z.; Gervais, C.; Sassoie, C.; Rimsza, J.; Du, J.; Smith, M. E.; Hanna, J. V.; Sarda, S.; Gras, P.; Combes, C.; Laurencin, D. Pushing the Limits of Sensitivity

- and Resolution for Natural Abundance ^{43}Ca NMR Using Ultra-High Magnetic Field (35.2 T). *Chem. Commun.* **2018**, 54 (69), 9591–9594. <https://doi.org/10.1039/C8CC05193C>.
- (66) Chen, S.; Lucier, B. E. G.; Chen, M.; Terskikh, V. V.; Huang, Y. Probing Calcium-Based Metal-Organic Frameworks via Natural Abundance ^{43}Ca Solid-State NMR Spectroscopy. *Chem. – Eur. J.* **2018**, 24 (35), 8732–8736. <https://doi.org/10.1002/chem.201802164>.
- (67) Kentgens, A. P. M.; Verhagen, R. Advantages of Double Frequency Sweeps in Static, MAS and MQMAS NMR of Spin $I=3/2$ Nuclei. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 300 (3), 435–443. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(98\)01402-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)01402-X).
- (68) Siegel, R.; Nakashima, T. T.; Wasylishen, R. E. Sensitivity Enhancement of MQMAS NMR Spectra of Spin $3/2$ Nuclei Using Hyperbolic Secant Pulses. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, 403 (4–6), 353–358.
- (69) Burgess, K. M. N.; Perras, F. A.; Moudrakovski, I. L.; Xu, Y.; Bryce, D. L. High Sensitivity and Resolution in ^{43}Ca Solid-State NMR Experiments. *Can. J. Chem.* **2015**, 93 (8), 799–807. <https://doi.org/10.1139/cjc-2014-0528>.
- (70) Ajili, W.; Laurent, G. P.; Menguy, N.; Gansmuller, A.; Huchette, S.; Auzoux-Bordenave, S.; Nassif, N.; Azais, T. Chemical Heterogeneities within the Disordered Mineral Domains of Aragonite Platelets in Nacre from the European Abalone *Haliotis Tuberculata*. *J. Phys. Chem. C* **2020**, 124 (26), 14118–14130. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c00280>.
- (71) Lee, D.; Leroy, C.; Crevant, C.; Bonhomme-Coury, L.; Babonneau, F.; Laurencin, D.; Bonhomme, C.; De Paëpe, G. Interfacial Ca^{2+} Environments in Nanocrystalline Apatites Revealed by Dynamic Nuclear Polarization Enhanced ^{43}Ca NMR Spectroscopy. *Nat. Commun.* **2017**, 8 (1), 14104. <https://doi.org/10.1038/ncomms14104>.
- (72) Bryce, D. L. Calcium Binding Environments Probed by (^{43}Ca) NMR Spectroscopy. *Dalton Trans. Camb. Engl.* **2010**, 39 (37), 8593–8602. <https://doi.org/10.1039/c0dt00416b>.
- (73) Laurencin, D.; Smith, M. E. Development of (^{43}Ca) Solid State NMR Spectroscopy as a Probe of Local Structure in Inorganic and Molecular Materials. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, 68, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2012.05.001>.
- (74) Gervais, C.; Laurencin, D.; Wong, A.; Pourpoint, F.; Labram, J.; Woodward, B.; Howes, A. P.; Pike, K. J.; Dupree, R.; Mauri, F.; Bonhomme, C.; Smith, M. E. New Perspectives on Calcium Environments in Inorganic Materials Containing Calcium–Oxygen Bonds: A Combined Computational–Experimental ^{43}Ca NMR Approach. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, 464 (1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.09.004>.
- (75) Wong, A.; Laurencin, D.; Wu, G.; Dupree, R.; Smith, M. E. An Ab Initio Quantum Chemical Investigation of ^{43}Ca NMR Interaction Parameters for the Ca^{2+} Sites in Organic Complexes and in Metalloproteins. *J. Phys. Chem. A* **2008**, 112 (40), 9807–9813. <https://doi.org/10.1021/jp801015y>.
- (76) Raftery, D.; MacNamara, E.; Fisher, G.; Rice, C. V.; Smith, J. Optical Pumping and Magic Angle Spinning: Sensitivity and Resolution Enhancement for Surface NMR Obtained with Laser-Polarized Xenon. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119 (37), 8746–8747. <https://doi.org/10.1021/ja972035d>.
- (77) Arzumanov, S. S.; Stepanov, A. G. Parahydrogen-Induced Polarization Detected with Continuous Flow Magic Angle Spinning NMR. *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117 (6), 2888–2892. <https://doi.org/10.1021/jp311345r>.
- (78) Lilly Thankamony, A. S.; Wittmann, J. J.; Kaushik, M.; Corzilius, B. Dynamic Nuclear Polarization for Sensitivity Enhancement in Modern Solid-State NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2017**, 102–103, 120–195. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.06.002>.

- (79) Rankin, A. G. M.; Trébosc, J.; Pourpoint, F.; Amoureux, J.-P.; Lafon, O. Recent Developments in MAS DNP-NMR of Materials. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2019**, *101*, 116–143. <https://doi.org/10.1016/j.ssnmr.2019.05.009>.
- (80) Jannin, S.; Dumez, J.-N.; Giraudeau, P.; Kurzbach, D. Application and Methodology of Dissolution Dynamic Nuclear Polarization in Physical, Chemical and Biological Contexts. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **2019**, *305*, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.06.001>.
- (81) Zysmilich, M. G.; McDermott, A. Photochemically Induced Dynamic Nuclear Polarization in the Solid-State ¹⁵N Spectra of Reaction Centers from Photosynthetic Bacteria Rhodobacter Sphaeroides R-26. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (18), 8362–8363. <https://doi.org/10.1021/ja00097a052>.
- (82) Harrison, J.; Sellars, M. J.; Manson, N. B. Optical Spin Polarisation of the N-V Centre in Diamond. *J. Lumin.* **2004**, *107* (1), 245–248. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2003.12.020>.
- (83) Overhauser, A. W. Polarization of Nuclei in Metals. *Phys. Rev.* **1953**, *92* (2), 411–415. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.92.411>.
- (84) Mentink-Vigier, F.; Akbey, U.; Hovav, Y.; Vega, S.; Oschkinat, H.; Feintuch, A. Fast Passage Dynamic Nuclear Polarization on Rotating Solids. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **2012**, *224*, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2012.08.013>.
- (85) Thurber, K. R.; Tycko, R. Theory for Cross Effect Dynamic Nuclear Polarization under Magic-Angle Spinning in Solid State Nuclear Magnetic Resonance: The Importance of Level Crossings. *J. Chem. Phys.* **2012**, *137* (8), 084508. <https://doi.org/10.1063/1.4747449>.
- (86) Hovav, Y.; Feintuch, A.; Vega, S. Theoretical Aspects of Dynamic Nuclear Polarization in the Solid State – Spin Temperature and Thermal Mixing. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *15* (1), 188–203. <https://doi.org/10.1039/C2CP42897K>.
- (87) Carver, T. R.; Slichter, C. P. Polarization of Nuclear Spins in Metals. *Phys. Rev.* **1953**, *92* (1), 212–213. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.92.212.2>.
- (88) Wind, R. A.; Anthonio, F. E.; Duijvestijn, M. J.; Smidt, J.; Trommel, J.; de Vette, G. M. C. Experimental Setup for Enhanced ¹³C NMR Spectroscopy in Solids Using Dynamic Nuclear Polarization. *J. Magn. Reson. 1969* **1983**, *52* (3), 424–434. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(83\)90168-3](https://doi.org/10.1016/0022-2364(83)90168-3).
- (89) Becerra, L. R.; Gerfen, G. J.; Temkin, R. J.; Singel, D. J.; Griffin, R. G. Dynamic Nuclear Polarization with a Cyclotron Resonance Maser at 5 T. *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *71* (21), 3561–3564. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.71.3561>.
- (90) Rosay, M.; Weis, V.; Kreischer, K. E.; Temkin, R. J.; Griffin, R. G. Two-Dimensional ¹³C–¹³C Correlation Spectroscopy with Magic Angle Spinning and Dynamic Nuclear Polarization. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (13), 3214–3215. <https://doi.org/10.1021/ja0176752>.
- (91) Hu, K.-N.; Yu, H.; Swager, T. M.; Griffin, R. G. Dynamic Nuclear Polarization with Biradicals. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (35), 10844–10845. <https://doi.org/10.1021/ja039749a>.
- (92) Lafon, O.; Thankamony, A. S. L.; Rosay, M.; Aussenac, F.; Lu, X.; Trébosc, J.; Bout-Roumazielles, V.; Vezin, H.; Amoureux, J.-P. Indirect and Direct ²⁹Si Dynamic Nuclear Polarization of Dispersed Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (28), 2864–2866. <https://doi.org/10.1039/C2CC36170A>.
- (93) Mao, J.; Aladin, V.; Jin, X.; Leeder, A. J.; Brown, L. J.; Brown, R. C. D.; He, X.; Corzilius, B.; Glaubitz, C. Exploring Protein Structures by DNP-Enhanced Methyl Solid-State NMR

- Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (50), 19888–19901. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11195>.
- (94) König, A.; Schölzel, D.; Uluca, B.; Viennet, T.; Akbey, Ü.; Heise, H. Hyperpolarized MAS NMR of Unfolded and Misfolded Proteins. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2019**, *98*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ssnmr.2018.12.003>.
- (95) Blanc, F.; Sperrin, L.; Jefferson, D. A.; Pawsey, S.; Rosay, M.; Grey, C. P. Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Natural Abundance 17O Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (8), 2975–2978. <https://doi.org/10.1021/ja4004377>.
- (96) Rossini, A. J.; Zagdoun, A.; Lelli, M.; Lesage, A.; Copéret, C.; Emsley, L. Dynamic Nuclear Polarization Surface Enhanced NMR Spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (9), 1942–1951. <https://doi.org/10.1021/ar300322x>.
- (97) Kobayashi, T.; Perras, F. A.; Slowing, I. I.; Sadow, A. D.; Pruski, M. Dynamic Nuclear Polarization Solid-State NMR in Heterogeneous Catalysis Research. *ACS Catal.* **2015**, *5* (12), 7055–7062. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b02039>.
- (98) Azaïs, T.; Von Euw, S.; Ajili, W.; Auzoux-Bordenave, S.; Bertani, P.; Gajan, D.; Emsley, L.; Nassif, N.; Lesage, A. Structural Description of Surfaces and Interfaces in Biominerals by DNP SENS. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2019**, *102*, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.ssnmr.2019.06.001>.
- (99) Vioglio, P. C.; Thureau, P.; Juramy, M.; Ziarelli, F.; Viel, S.; Williams, P. A.; Hughes, C. E.; Harris, K. D. M.; Mollica, G. A Strategy for Probing the Evolution of Crystallization Processes by Low-Temperature Solid-State NMR and Dynamic Nuclear Polarization. *J. Phys. Chem. Lett.* **2019**, *10* (7), 1505–1510. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.9b00306>.
- (100) Juramy, M.; Chèvre, R.; Cerreia Vioglio, P.; Ziarelli, F.; Besson, E.; Gastaldi, S.; Viel, S.; Thureau, P.; Harris, K. D. M.; Mollica, G. Monitoring Crystallization Processes in Confined Porous Materials by Dynamic Nuclear Polarization Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (16), 6095–6103. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c12982>.
- (101) Thurber, K. R.; Potapov, A.; Yau, W.-M.; Tycko, R. Solid State Nuclear Magnetic Resonance with Magic-Angle Spinning and Dynamic Nuclear Polarization below 25 K. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **2013**, *226*, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2012.11.009>.
- (102) Lee, D.; Bouleau, E.; Saint-Bonnet, P.; Hediger, S.; De Paëpe, G. Ultra-Low Temperature MAS-DNP. *J. Magn. Reson.* **2016**, *264*, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2015.12.010>.
- (103) Mathies, G.; Caporini, M. A.; Michaelis, V. K.; Liu, Y.; Hu, K.-N.; Mance, D.; Zweier, J. L.; Rosay, M.; Baldus, M.; Griffin, R. G. Efficient Dynamic Nuclear Polarization at 800 MHz/527 GHz with Trityl-Nitroxide Biradicals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (40), 11770–11774. <https://doi.org/10.1002/anie.201504292>.
- (104) Wisser, D.; Karthikeyan, G.; Lund, A.; Casano, G.; Karoui, H.; Yulikov, M.; Menzildjian, G.; Pinon, A. C.; Pura, A.; Engelke, F.; Chaudhari, S. R.; Kubicki, D.; Rossini, A. J.; Moroz, I. B.; Gajan, D.; Copéret, C.; Jeschke, G.; Lelli, M.; Emsley, L.; Lesage, A.; Ouari, O. BDPA-Nitroxide Biradicals Tailored for Efficient Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Solid-State NMR at Magnetic Fields up to 21.1 T. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (41), 13340–13349. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08081>.
- (105) Menzildjian, G.; Lund, A.; Yulikov, M.; Gajan, D.; Niccoli, L.; Karthikeyan, G.; Casano, G.; Jeschke, G.; Ouari, O.; Lelli, M.; Lesage, A. Efficient Dynamic Nuclear Polarization up to 230 K with Hybrid BDPA-Nitroxide Radicals at a High Magnetic Field. *J. Phys. Chem. B* **2021**, *125* (48), 13329–13338. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c07307>.
- (106) Lilly Thankamony, A. S.; Lafon, O.; Lu, X.; Aussenac, F.; Rosay, M.; Trébosc, J.; Vezin, H.; Amoureux, J.-P. Solvent-Free High-Field Dynamic Nuclear Polarization of Mesoporous Silica

- Functionalized with TEMPO. *Appl. Magn. Reson.* **2012**, *43* (1), 237–250. <https://doi.org/10.1007/s00723-012-0364-3>.
- (107) Ong, T.-C.; Mak-Jurkauskas, M. L.; Walish, J. J.; Michaelis, V. K.; Corzilius, B.; Smith, A. A.; Clausen, A. M.; Cheetham, J. C.; Swager, T. M.; Griffin, R. G. Solvent-Free Dynamic Nuclear Polarization of Amorphous and Crystalline Ortho-Terphenyl. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (10), 3040–3046. <https://doi.org/10.1021/jp311237d>.
- (108) Lim, B. J.; Ackermann, B. E.; Debelouchina, G. T. Targetable Tetrazine-Based Dynamic Nuclear Polarization Agents for Biological Systems. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2020**, *21* (9), 1315–1319. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900609>.
- (109) Svirinovsky-Arbeli, A.; Carmieli, R.; Leskes, M. Multiple Dynamic Nuclear Polarization Mechanisms in Carbonaceous Materials: From Exogenous to Endogenous ¹³C Dynamic Nuclear Polarization-Nuclear Magnetic Resonance up to Room Temperature. *J. Phys. Chem. C* **2022**, *126* (30), 12563–12574. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c02470>.
- (110) Harrabi, R.; Halbritter, T.; Aussenac, F.; Dakhlaoui, O.; van Tol, J.; Damodaran, K. K.; Lee, D.; Paul, S.; Hediger, S.; Mentink-Vigier, F.; Sigurdsson, S. Th.; De Paëpe, G. Highly Efficient Polarizing Agents for MAS-DNP of Proton-Dense Molecular Solids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61* (12), e202114103. <https://doi.org/10.1002/anie.202114103>.
- (111) Lund, A.; Casano, G.; Menzildjian, G.; Kaushik, M.; Stevanato, G.; Yulikov, M.; Jabbour, R.; Wisser, D.; Renom-Carrasco, M.; Thieuleux, C.; Bernada, F.; Karoui, H.; Siri, D.; Rosay, M.; Sergeyev, I. V.; Gajan, D.; Lelli, M.; Emsley, L.; Ouari, O.; Lesage, A. TinyPols: A Family of Water-Soluble Binitroxides Tailored for Dynamic Nuclear Polarization Enhanced NMR Spectroscopy at 18.8 and 21.1 T. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (10), 2810–2818. <https://doi.org/10.1039/C9SC05384K>.
- (112) Hu, K.-N.; Bajaj, V. S.; Rosay, M.; Griffin, R. G. High-Frequency Dynamic Nuclear Polarization Using Mixtures of TEMPO and Trityl Radicals. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126* (4), 044512. <https://doi.org/10.1063/1.2429658>.
- (113) Baudot, A.; Alger, L.; Boutron, P. Glass-Forming Tendency in the System Water–Dimethyl Sulfoxide. *Cryobiology* **2000**, *40* (2), 151–158. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2234>.
- (114) Corzilius, B.; Smith, A. A.; Griffin, R. G. Solid Effect in Magic Angle Spinning Dynamic Nuclear Polarization. *J. Chem. Phys.* **2012**, *137* (5), 054201. <https://doi.org/10.1063/1.4738761>.
- (115) Akbey, Ü.; Franks, W. T.; Linden, A.; Lange, S.; Griffin, R. G.; van Rossum, B.-J.; Oschkinat, H. Dynamic Nuclear Polarization of Deuterated Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (42), 7803–7806. <https://doi.org/10.1002/anie.201002044>.
- (116) Corzilius, B.; Andreas, L. B.; Smith, A. A.; Ni, Q. Z.; Griffin, R. G. Paramagnet Induced Signal Quenching in MAS-DNP Experiments in Frozen Homogeneous Solutions. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **2014**, *240*, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2013.11.013>.

**Chapitre III – Impact des paramètres
expérimentaux sur la quantité et la stabilité des
clusters de prénucléation lors la formation de
l’hydroxyapatite**

CHAPITRE III – CONTROLE CINETIQUE DES ESPECES TRANSITOIRES INTERVENANT DANS LA FORMATION D’HYDROXYAPATITE	135
I. INTRODUCTION	139
II. ARTICLE 1 : FACTORS AFFECTING CALCIUM PHOSPHATE PRENUCLEATION CLUSTERS UNDER BIOLOGICAL-LIKE CONDITIONS	141
III. CONCLUSION DE L’ARTICLE	174
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	176

I. Introduction

Dans la littérature, pléthores d'études s'intéressent à la formation d'hydroxyapatite. De manière non exhaustive, nous avons recensé ci-dessous les principales méthodes de synthèses qui peuvent être regroupées en trois catégories¹ :

- Voie sèche :
 - o Synthèse en phase solide
 - o Mécanochimie
- Voie humide :
 - o Précipitation
 - o Voie hydrothermale
 - o Hydrolyse
- Méthodes à haute température ($600\text{ °C} \leq T \leq 1100\text{ °C}$) :
 - o Combustion
 - o Pyrolyse

Lors des synthèses par voie humide, il se forme premièrement une phase transitoire amorphe d'ACP évoluant ensuite en HAP^{2,3}. En particulier, Posner et Betts³ ont proposé que ce même mécanisme pouvait être à l'origine de la formation du minéral osseux *in vivo*. Dans un contexte de biominéralisation, les synthèses *in vitro* utilisent généralement une voie de synthèse humide dans des conditions proches de la physiologie telles que :

- Des concentrations en ions calcium et phosphates de l'ordre du mM (qui sont respectivement de l'ordre de 2,5 et 1 mM dans le plasma⁴).
- Un pH proche de la neutralité, typiquement proche de 7,4.
- Une force ionique comparable à celle du plasma sanguin ($\approx 150\text{ mM}$).
- Une température de travail comprise entre T_{amb} et 37 °C .

La précipitation est alors initiée à la suite du mélange d'une solution d'ions phosphates avec une solution d'ions calcium dans ces conditions. Par ailleurs, la cinétique de la précipitation peut être contrôlée en choisissant minutieusement les paramètres de précipitation décrits ci-dessus. Citons par exemple les travaux de Termine et Posner^{5,6} qui ont étudié l'influence de divers paramètres expérimentaux sur la cinétique de précipitation de phosphate de calcium amorphe et de l'évolution de cette phase. En particulier, les effets des paramètres initiaux de la précipitation (concentrations relatives et absolues en ions phosphates et calcium, force ionique, pH, température et additifs organiques et inorganiques) sur la cinétique de formation d'ACP et de sa transformation en HAP sont étudiées dans des conditions proches de la physiologie.

Si à l'époque, seul l'ACP avait été décrit comme une phase transitoire précédant la cristallisation d'HAP, le développement de la microscopie électronique a permis d'identifier au moins une autre phase transitoire supposée une phase amorphe de morphologie floculaire intervenant entre la nucléation de sphères d'ACP et la cristallisation d'HAP⁷. Néanmoins, d'autres études ont proposé que la brushite, l'OCP^{8,9} ou une phase d'OCP déficiente en calcium¹⁰ pouvaient intervenir en tant que phase transitoire entre l'ACP et l'HAP.

Récemment, la découverte de clusters ioniques solubles de prénucléation par potentiométrie calcium et cryo-TEM a permis d'ajouter une étape supplémentaire dans ce mécanisme et de le qualifier de non-classique, remettant en question l'origine des modèles décrits jusqu'à présent^{10,11}, car ces phases transitoires seraient issues de ces clusters solubles. Tantôt proposé comme étant les clusters de Posner $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ suggérés comme étant l'unité structurale d'ACP¹¹, comme des ions calcium triphosphates¹⁰ ou encore comme des paires ioniques¹², il n'y a pas encore de consensus s'accordant sur la structure et la composition de ces PNC. La taille nanométrique de ces objets, leur caractère soluble et leur comportement dynamique (échanges ioniques et temps de vie court) représentent des défis expérimentaux quant à leur caractérisation, si bien qu'il n'existe que très peu d'études s'y intéressant. Parfois étudiée dans du SBF, avec des additifs organiques¹¹ ou en conditions purement inorganiques¹⁰, il n'y a pas assez de données expérimentales pour élaborer des modèles complets discutant de (i) leur composition, (ii) leur proportion et de (iii) leur temps de vie avant nucléation.

Ce chapitre s'intéresse à l'étude de ces trois caractéristiques lors de la synthèse d'HAP « biomimétique » en milieu aqueux. En particulier, nous quantifions ces grandeurs en variant les paramètres initiaux de la précipitation :

- La concentration absolue en ions calcium et phosphates calculée comme le produit des concentrations initiales en ions calcium et en phosphates $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}}$. Dans cette étude, les gammes de concentrations en ions calcium et phosphates étaient respectivement 3,46—7,66 mM et 2,6—5,74 mM.
- La concentration relative en ions calcium et phosphates quantifiée par le rapport des concentrations initiales en ions calcium et en phosphates $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$. En particulier, les valeurs de $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ ont été choisies pour encadrer le rapport Ca/P de l'hydroxyapatite, telle que $0,67 \leq \text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} \leq 2,67$.
- Le pH (7,3—7,7).
- La force ionique (0—300 mM).

En effet, les études de Termine et Posner^{5,6} ont relevé que ces paramètres avaient une influence sur les cinétiques de nucléation et de stabilité d'ACP, il est donc probable que ces mêmes paramètres influencent les PNC. Les techniques d'analyse choisies sont les suivantes :

- La potentiométrie du calcium nous a permis de déterminer la concentration en ions calcium liés sous forme de PNC avant précipitation et de mesurer le temps de vie des PNC, mesuré comme le temps précédant la nucléation.
- La RMN ³¹P en solution *in situ* nous a permis de mesurer la concentration en ions phosphates libres au cours du temps, permettant de calculer le rapport Ca/P des espèces de PNC et des phases solides transitoires.
- Les observations par cryo-TEM ont permis d'observer les PNC formés sous différentes conditions de précipitation.
- Les mesures potentiométriques du pH ont permis de mesurer le temps de vie des PNC et d'étudier le relargage protonique des ions phosphates permettant de remonter à l'état de protonation des ions phosphates dans les PNC en solution.

Par ailleurs, la phase finale formée dans chacune de nos conditions a été caractérisée par DRX, TEM et RMN du solide. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un chapitre prêt à être soumis et intitulé « Experimental factors controlling prenucleation clusters proportion and lifetime during

hydroxyapatite formation ». L'étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Dennis Kurzbach, Professeur associé à l'Institut de Chimie Biologique à l'Université de Vienne, pour son expertise en RMN en solution résolue dans le temps.

II. Article 1 : Experimental factors controlling prenucleation clusters proportion and lifetime during hydroxyapatite formation

Experimental factors controlling prenucleation clusters proportion and lifetime during hydroxyapatite formation

Tristan Georges¹, Ludovica M. Epasto², Jean-Michel Guigner³, Dennis Kurzbach² and Thierry Azais^{1*}

¹*Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), 4, Place Jussieu, F-75005 Paris, France*

²*Faculty of Chemistry, Institute of Biological Chemistry, University Vienna, Währinger Str. 38, 1090 Vienna, Austria*

³*Sorbonne Université, Institut de Minéralogie et Physique des Milieux Condensés (IMPMC), 4, Place Jussieu, F-75005 Paris, France*

* Corresponding author: thierry.azais@upmc.fr

Abstract:

It has recently been reported that hydroxyapatite formation can follow a non-classical mechanism of nucleation where free ions assemble into soluble and nanometric entities known as prenucleation clusters (PNC) before aggregation leading to calcium phosphate nucleation. Prenucleation cluster formation and aggregation mechanisms appear to be key events in driving apatite crystallization. However, such events remain unclear because of their solute, nanometric and highly dynamic nature that make their dynamics and structure challenging to characterize. In this work, we investigate the initial precipitation parameters namely ionic concentrations, pH and ionic strength on PNC both proportion and lifetime before nucleation. For such purpose we use calcium potentiometry to quantify calcium inside PNC and nucleation kinetics. We found that both PNC lifetime and bound calcium proportion may drastically vary when initial precipitation parameters are modified, ranging from seconds to hours and from 5 to 16% of the total amount of calcium, respectively. Both features are related as PNC lifetime exponentially decreases with increasing proportion of PNC. Finally, contribution of in situ ³¹P solution NMR allows the identification of PNC as soluble calcium triphosphate entities. This study brings a useful methodology to study transient prenucleation clusters based on time-resolved analysis.

Introduction:

The formation of hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HAP) is a phenomenon of overmost importance in the fields of geology, biomineralization or biomaterial design for bone graft applications. In a biomineralization context, HAP is the most abundant component of bones and teeth¹⁻⁴. In particular, bone apatite consists of nanometric platelets composed of a crystalline core and a hydrated amorphous calcium phosphate layer⁵⁻⁷. *In vitro* studies of HAP mineralization from aqueous solutions revealed that HAP formation deviate from the classical nucleation theory⁸⁻¹⁰ by following a non-classical mechanism of nucleation where free calcium and phosphate ions assemble into stable nanometric solutes called prenucleation clusters (PNC). PNC tend to aggregate over time until nucleating into an amorphous calcium phosphate (ACP) phase that lately evolves into crystalline HAP sometimes through transient crystalline phases such as octacalcium phosphate (OCP)⁹.

In the field of non-classical pathway of nucleation, PNC were first discussed for calcium carbonates formation. PNC were first evidenced using calcium potentiometry and ultracentrifugation¹¹, before being observed through cryo-TEM¹² as nanometric species (~1 nm). Such clusters has been described as CaCO_3^0 ion pairs that would aggregate into larger flexible species dubbed dynamically ordered liquid-like oxyanion polymer¹³, although recent study suggests that HCO_3^- ions can be involved in amino acid-stabilized PNC¹⁴. Since, PNC have also been observed in the field of the precipitation of calcium oxalate^{15,16}, iron(oxy)(hydr)oxides¹⁷⁻¹⁹, silica²⁰⁻²² and some organic compounds such as amino acids²³⁻²⁵.

In the case of calcium phosphate, prenucleation species were first described in 2010 by Dey *et al.*⁸ through cryo-TEM observations where size measurements suggested that they are structurally related to Posner's clusters $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, a solid cluster proposed to be the primary component of ACP in the early 1970s²⁶. In 2013, Habraken *et al.* describe calcium phosphate PNC as calcium triphosphate units $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)^{3-}$ based on calcium potentiometry and *ab initio* calculation⁹ lately supported by molecular dynamics simulation²⁷. On the other hand, Garcia *et al.* suggest that calcium phosphate $\text{Ca}(\text{HPO}_4)$ would be stabler than the calcium triphosphate model²⁸. More recently, solution NMR appears as a promising technique because of its ability to bring structural information at the atomic scale. Recently, ³¹P solution NMR was used to quantify the amount of PNC and understand their dynamical features^{10,29}. In particular, Epasto *et al.* used real-time ³¹P solution NMR to show that simulated body fluid undergoes the formation and aggregation of PNC for 24h right after preparation. The exchange phosphate rate between the bound and free form depends on the overall size of PNC aggregates. On the other hand, Weber *et al.* used Dissolution-DNP to assess size and dynamical informations (formation and free-to-bound exchange rates) about PNC prior brushite fast precipitation (< 20 s)²⁹.

Although articles reporting PNC studies increase, the composition, structure and dynamical behavior of these transient species remain unclear, due to a lack of appropriate characterization techniques able to track or isolate PNC. Previous studies from Termine and Posner demonstrated that ACP nucleation³⁰ and crystallization³¹ from aqueous solution are time dependent from the initial precipitation parameters. In particular, they show that increasing initial relative and absolute ionic concentrations, pH or temperature and decreasing ionic strength led to a shorter induction time before ACP nucleation.

Since PNC precedes ACP formation, here we investigate the influence of the initial parameters such as absolute and relative concentrations, pH and ionic strength onto PNC proportion and lifetime. Conditions were chosen to obtain hydroxyapatite as a final product close to physiological conditions, *i.e.* calcium and phosphate concentrations, pH and ionic strength close to 10^0 mM, 7.4 and 150 mM, respectively. To do so, we combined time-resolved and quantitative methods such as calcium potentiometry and pH measurements in order to determine ionic concentrations inside PNC and PNC lifetime defined as the induction time preceding ACP nucleation, respectively. We found that the lower the PNC lifetime was, the higher was the proportion of PNC in solution. In particular, higher absolute concentrations, pH and ionic strengths led to both higher amounts of PNC and shorter PNC lifetime. Observed trends were combined with *in situ* ^{31}P solution NMR to evidence that PNC composition is maintained in our conditions and are calcium triphosphate units.

Materials & Methods:

Mineralization solutions.

All reagents used for synthesis have been purchased at Sigma-Aldrich and Merck, used as received and dissolved in Milliq Water. Typically, a stock solution was prepared dissolving Tris buffer (50 mM) and KCl (150 mM) as an ionic strength adjuster, before adjusting pH to 7.40 ± 0.01 using HCl 1M or HCl 0.1M. Then, preparation of separated solutions of calcium and phosphate of various and physiological-like concentrations was performed dissolving $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in the stock solution under magnetic stirring. Both concentrations of calcium and phosphate were doubled in order to obtain the desired concentrations after mixing equal volumes of each solution. Then, pH was readjusted at $\text{pH } 7.40 \pm 0.01$ with HCl 0.1M or NaOH 0.1M if needed and all solutions were stored at room temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$). Initial concentrations were calculated to match various initial Ca^{2+} -to-phosphate molar ratios ($\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$) and products ($\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}}$) (Table 1). The $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ ratios were chosen to surround 1.67, the Ca/P ratio of stoichiometric hydroxyapatite. The $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}}$ products were selected to study different kinetics regimes from slow (\approx hours) to fast (\approx seconds) precipitations³⁰. For pH variation study, HCl 0.1M/1M and NaOH 0.1M/1M were added in individual calcium and phosphate solutions to reach the desired pH value (7.3, 7.4, 7.5, 7.55, 7.6 and 7.7). For ionic strength (IS) variation study, various amounts of KCl (0, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mM) were added into the stock solution.

[Ca ²⁺] (mM)	[P _i] (mM)	Ca×P (mM ²)	Ca/P
5.89	4.42	26	1.33
6.58	3.95	26	1.67
3.83	5.74	22	0.67
5.42	4.06	22	1.33
6.06	3.63	22	1.67
6.63	3.32	22	2.00
7.66	2.87	22	2.67
3.46	5.20	18	0.67
4.90	3.67	18	1.33
5.48	3.29	18	1.67
6.00	3.00	18	2.00
6.93	2.60	18	2.67
4.32	3.24	14	1.33
4.83	2.90	14	1.67

Table 1. Initial concentrations of calcium and phosphate solutions for mineralization reactions.

Mineralization reactions.

Same volumes of both calcium and phosphate solution were mixed under magnetic stirring to start the mineralization reaction. However, mechanical stirring and temperature are most likely to be involved into nucleation kinetics^{30,32}. To reduce any influence of temperature and stirring, these parameters were kept identical for all mineralization reactions. All measurements were conducted at room temperature (21±2 °C) with a constant stirring of 500 rpm.

In addition of measuring PNC amounts and proportions in all of our investigated mineralization conditions, we also characterize the final mineral phase after one week of aging time. After 1 week, Solutions were then centrifugated and washed 3 times with double-distilled water before lyophilization for 16 hours. Then, the final product was characterized by X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM) and solid-state NMR. The results for the following mineralizing condition Ca/P_{ini} = 2, Ca×P_{ini} = 18 mM² (pH 7.4 and IS = 0.15 M) are displayed in **Fig SI 1**.

XRD patterns were compared with JCPDS-9-432 file corresponding to pure hydroxyapatite (**Fig SI 1A**) excluding any other calcium phosphate polymorphs. Then, powders were observed with TEM as nanometric platelets of roughly 50–80 nm length for 30 nm width (**Fig SI 1B**). To go further into the analysis, ³¹P solid-state NMR revealed a single resonance at 2.8 ppm characteristic of HAP (**Fig SI 1C**)³³. Two-dimensional ¹H—³¹P HetCor (**Fig SI 1D**) unambiguously revealed the presence of two environments correlating with protons at 0 ppm and from 5 to 12.5 ppm, respectively, corresponding to OH⁻ ions from hydroxyapatite and H₂O/P-OH typical of hydrated and protonated phosphates. This finding is in accordance with the presence of an amorphous surface layer around HAP particles. Positions and linewidths of the extracted slices at 0 and 5.5 ppm (**Fig SI 1E**) are in agreement with

previous studies^{7,34}. Results were similar in all investigated conditions. In conclusion, all of our mineralization condition led to biomimetic HAP after one week of aging time.

Calcium ion and pH potentiometry.

Calcium ion and pH potentiometry experiments were performed using a calcium ion-selective electrode (Ca-ISE) and a pH electrode to respectively monitor the calcium potential and the pH over time with the software Tiamo 2.5 all manufactured by Metrohm. The pH electrode was calibrated using pH 4.01, pH 7.00 and pH 9.21 standard buffers. The Ca-ISE was calibrated using three Ca^{2+} solutions (1 mM, 5 mM and 20 mM) buffered at various pH (TRIS 50 mM) with various amounts of KCl as an ionic strength adjuster. Since ion selective electrodes measurements depends on ionic strength, temperature and pH, calibration solutions were kept as close as possible to solutions. Before and between each experiment, electrodes were washed with acetic acid (0.1 M), rinsed with double-distilled water, and recalibrated. Every experiment was performed at least twice on freshly prepared solutions.

Calcium ion and pH potentiometry curves were acquired by recording one measurement per second or every 10 seconds depending on the overall duration of the experiment. For mineralization reaction, both calcium and pH electrodes stand first in the calcium solution. Once both calcium potential and pH were found stable (typically after 1 to 5 min), the phosphate solution was rapidly added under magnetic stirring.

Real time *in situ* ^{31}P solution NMR.

The ^{31}P spectra were acquired on a Bruker NEO NMR spectrometer operating at 11.7 T (500 MHz proton Larmor frequency, 202 MHz ^{31}P Larmor frequency) equipped with a 5 mm Bruker Prodigy BBFO cryoprobe to maximize sensitivity. An external capillary containing $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5.9mM) dissolved in D_2O was used to assess both proper locking of the signal and quantitativity. All ^{31}P chemical shifts were referenced to H_3PO_4 (0 ppm).

Real-time detection was achieved by recording one ^{31}P spectra every 300 s (NS = 40). The total duration of the experiments was 4–15 hours. The ^{31}P spectra were acquired using a 90° pulse length of 12 μs . Collected data were subsequently zero filled, apodized using a Gaussian window function, Fourier transformed and baseline-corrected. For every spectrum, integration of the signal of interest was manually performed and normalized to the initial phosphate concentration, in accordance with the external capillary containing dissolved $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in D_2O . To compensate for the absence of stirring during mineralization, experiments were performed at 37°C .

Cryo electron microscopy.

Cryo-TEM images were recorded on ultrascan 1000, 2k x 2k CCD camera (Gatan, USA), using a LaB6 JEOL JEM2100 (JEOL, Japan) cryo microscope operating at 200kV with a JEOL low dose system (Minimum Dose System, MDS) to protect the thin ice film from any irradiation before imaging and reduce the irradiation during the image capture. A drop (3 μl) of the mineralizing solution was deposited on “quantifoil”[®] (Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany) carbon membrane grids. The

excess of solution on the grid was absorbed with a filter paper and the grid was rapidly quench-frozen in liquid ethane to form a thin vitreous ice film. The samples were loaded inside the microscope and observed at cryogenic temperature (-180 °C).

³¹P solid-state NMR.

Solid-state nuclear magnetic resonance experiments were conducted using an Avance-III 300 Bruker spectrometer. Lyophilized powders were packed into 4 mm zirconia rotors and experiments were achieved using magic angle spinning (MAS) at a spinning frequency (ν_{MAS}) of 8 kHz using a Bruker 4BL CP/MAS ¹H/BB probe. ¹H and ³¹P chemical shifts were referenced using pure HAP powder (as secondary reference) at 0 ppm and 2.8 ppm, respectively.

The ³¹P direct excitation was performed using a 30° pulse every 10 s under ¹H high power decoupling (spinal-64) set to $\nu(^{1}\text{H})_{\text{RF}} = 55$ kHz.

For ¹H-³¹P cross-polarization (CP) experiments, the recycle delay (RD) was set to 2 s and acquisition were done under spinal-64 decoupling at $\nu(^{1}\text{H})_{\text{RF}} = 55$ kHz. The Hartman-Hahn condition was found to be optimal at ¹H and ³¹P radio-frequencies corresponding to 58 kHz and 42 kHz, respectively. The CP contact time (t_{CP}) was set to 1 ms. Two-dimensional (2D) ¹H-³¹P HETCOR spectra were acquired using States-TPPI scheme using 256 t_1 increments.

X-Ray Diffraction.

Lyophilized powders were packed into PMMA sample holders. X-ray diffraction (XRD) measurements were carried out using Cu K α ($\lambda=1.54\text{\AA}$) radiation in a Bruker D8 Advance diffractometer with a Lynx eye detector. The 2 θ diffractograms were recorded between 6 and 80° with a step size of 0.0215° and a step time of 1s/step for a total experimental time of 57 min. Hydroxyapatite crystalline phase was identified using JCPDS-9-432 file corresponding to pure hydroxyapatite.

Results & Discussion

Methodological approach

The PNC proportion and lifetime were determined by means of calcium potentiometry and pH measurements. The **Figure 1A** displays a representative example for the following condition: $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 2$, $\text{Ca}\times\text{P}_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$ (pH 7.4 and IS = 0.15 M). One can first observe that pH and free calcium concentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ follow same trends with respect to time suggesting calcium binding and proton release are correlated during mineralization. Both pH and free calcium concentration undergo three successive drops corresponding ACP nucleation, crystallization of an OCP-like structure and HAP crystallization, as proposed by Habraken *et al.*⁹. Right after mixing and before nucleation, we detect a lower free calcium concentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ than the initial Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ that seems to reach a plateau after 10 min in **Fig 1C**. As we did not observe any visible precipitation, this difference between initial and detected Ca^{2+} concentration is assigned to the formation of bonded Ca^{2+} into PNC. Similar results are observed for others conditions (**Fig SI 2**, **Fig SI 3**). Accordingly, PNC were observed through cryo-TEM observations by quenching the solution 5 minutes after mixing *i.e.* before nucleation

(Fig 1B). Individual PNC (*i.e.* the smallest observed objects) consisted of small clusters of 1–2 nm in size which is consistent with previous studies^{8–10}.

Associated with pH measurement, Ca-potentiometry enables to unambiguously determine PNC lifetime (Fig 1C) which corresponds to the induction time preceding the first drop of both pH and free Ca²⁺ concentration. Then, the difference between [Ca²⁺]_{free} and the initial Ca²⁺ concentration [Ca²⁺]_{tot} was calculated to determine the bound calcium concentration inside PNC [Ca²⁺]_{bound} as follows:

$$[Ca^{2+}]_{bound} = [Ca^{2+}]_{tot} - [Ca^{2+}]_{free} \quad (1)$$

For this calculation, we considered the free calcium concentration at the end of the plateau *i.e.* just preceding nucleation corresponding to the first strong decrease in Ca²⁺ concentration and pH (Fig 1B, Fig SI 2B, Fig SI 3). Proportions of [Ca²⁺]_{bound} inside PNC over [Ca²⁺]_{tot} are calculated as follows:

$$\%[Ca^{2+}]_{bound} = \frac{[Ca^{2+}]_{tot} - [Ca^{2+}]_{bound}}{[Ca^{2+}]_{tot}} \quad (2)$$

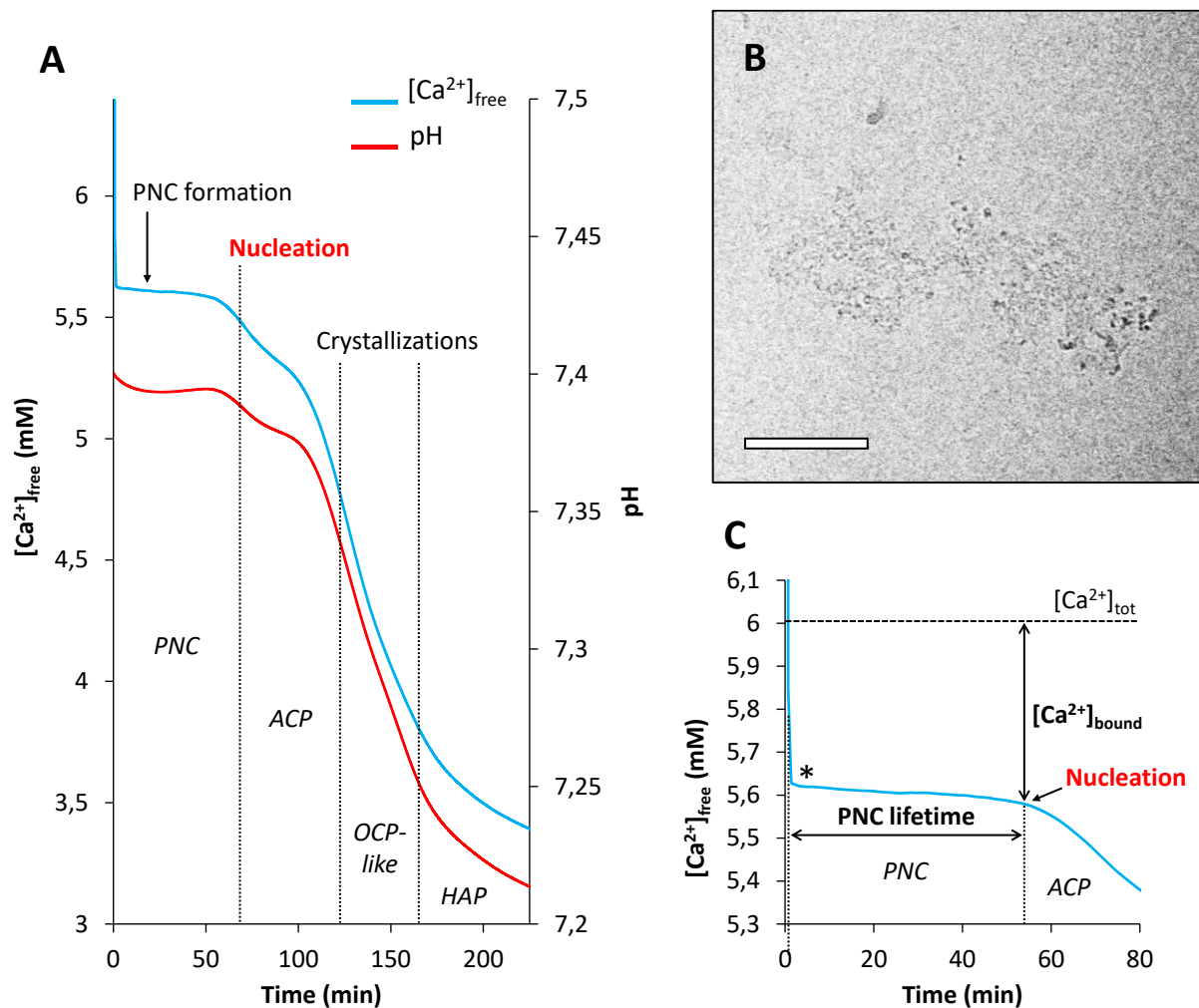


Figure 1 : (A) Representative example of calcium (blue line) and pH (red line) potentiometry monitoring of calcium phosphate mineralization reaction. (B) Determination of bound calcium concentration inside PNC [Ca²⁺]_{bound}, and PNC lifetime using Ca-potentiometry. Mineralization conditions: Ca/P_{ini} = 0.67, Ca×P_{ini} = 22 mM², pH 7.4, IS = 150 mM.

Influence of the initial Ca^{2+} and phosphate concentrations

We first studied the variation of absolute concentrations $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}}$ initial product at given $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ ratios. For $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 1.67$ (the Ca/P of stoichiometric hydroxyapatite), we observe that increasing $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}}$ from 14 to 26 mM^2 lead to an increase of the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}}$ from 4.9 to 10.3% (**Fig 2A**). Concerning the induction time, we observe that increasing absolute concentrations reduced the PNC lifetime from 7 hours to 3.5 minutes (**Fig 2B**). These two observations might be explained by the increase of ions collisions when the amount of calcium and phosphate ions increases in solution, leading to the increase of the PNC proportion. Similarly, a higher PNC proportions increases the chance they have to collide and aggregate, leading to a faster nucleation. Interestingly, similar trends are observed for $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 1.33$ (**Fig SI 4**) where $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}}$ increases from 5.6 to 10.9% when $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}}$ from 14 to 26 mM^2 , while PNC lifetime exponentially decreases from 7 hours to 6 minutes.

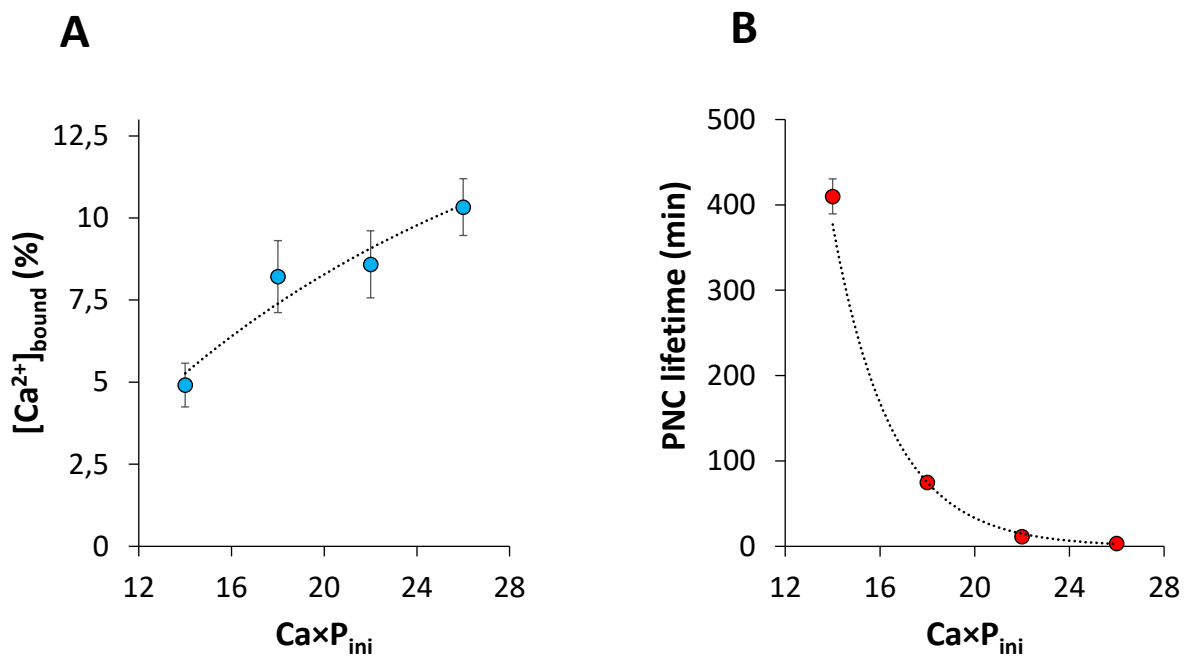


Figure 2 : (A) Relative proportions of bound Ca^{2+} and (B) PNC lifetime according to different $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}}$ products for the following mineralization condition: $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 1.67$, pH 7.4, IS = 150 mM.

The impact of the relative concentrations $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ at constant $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}}$ values was similarly studied. In the case of $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$, when increasing $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ from 0.67 to 2.67, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}}$ exponentially decreased from 10.9 to 6.1% (**Fig 3A**). For low $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$, phosphate ions are in large excess compare to Ca^{2+} ions, therefore higher proportions of bound Ca^{2+} are found, while Ca^{2+} ions are in excess with respect to phosphate ions leading to a reduced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}}$ reduced PNC formation at high $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$. However, we noticed absolute $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}}$ inside PNC was maximal at 0.43 mM) for $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} \sim 1.33$ –1.67 (**Fig 3B**). This finding is in good agreement with the final biomimetic HAP phase we obtain in all of our conditions. The latter is known to be calcium-deficient and exhibit Ca/P ratio of ≈ 1.5 due to the presence of the disordered surface layer onto the crystalline core³⁴, as well as carbonate, hydrogen phosphate or sodium (among others) ionic substitutions leading to calcium vacancies in the lattice³⁵. As all solutions evolve toward biomimetic HAP, and HAP form from PNC, higher number of

ionic collisions leading to PNC formation are non-surprisingly observed for $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = \text{Ca}/\text{P}_{\text{HAP}}$ (**Fig SI 5**). In other words, higher PNC proportions are favored through low $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ values, while high PNC concentrations are enhanced using $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = \text{Ca}/\text{P}_{\text{HAP}} \sim 1.5$.

Following the same tendency, one might expect that PNC lifetime would be shorter for $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} \approx 1.33\text{—}1.67$, given the higher PNC concentration. However, this was not so clearly observed as nucleation was accelerated from more than 8 hours to 28 minutes when increasing $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ from 0.67 to 2.67 (**Fig 3C**). In particular, we observe that PNC tends to nucleate faster when remaining free calcium ions during the prenucleation stage $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free,PNC}}$ are higher in proportion thus corresponding to high $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ values (**Fig 3D**). The mineralization condition $\text{Ca} \times \text{P} = 22 \text{ mM}^2$, pH 7.4, IS = 150 mM, showed similar trends varying $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ from 0.67 to 2.67 (**Fig SI 6**):

- Exponential decay of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}}$ from 14.9 to 6.7%.
- $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}} = 0.53 \text{ mM}$ for $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} \approx 1.33\text{—}1.67$.
- Exponential decay of PNC lifetime with increasing $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free,PNC}}$ from 46 to 4 min.

To summarize, variation of $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ highlight three different effects on PNC formation and crystallization: *i*) a quantitative effect on the proportion of PNC at low $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$, *ii*) a quantitative effect on the amount of PNC that would be maximal at $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ close to hydroxyapatite Ca/P and *iii*) nucleation kinetics appear to rely on both PNC and remaining Ca^{2+} ions amount in solution. These last results suggest that nucleation and crystallizations events are mainly occurring through a calcium uptake overtime as seen by calcium potentiometry experiments (**Fig 1A, Fig SI 2**) displaying the decrease of free calcium concentration all along the mineralization process. Moreover, the successive precipitation events are in line with both calcium uptake and proton release, the latter would be induced by phosphate ions deprotonation upon time.

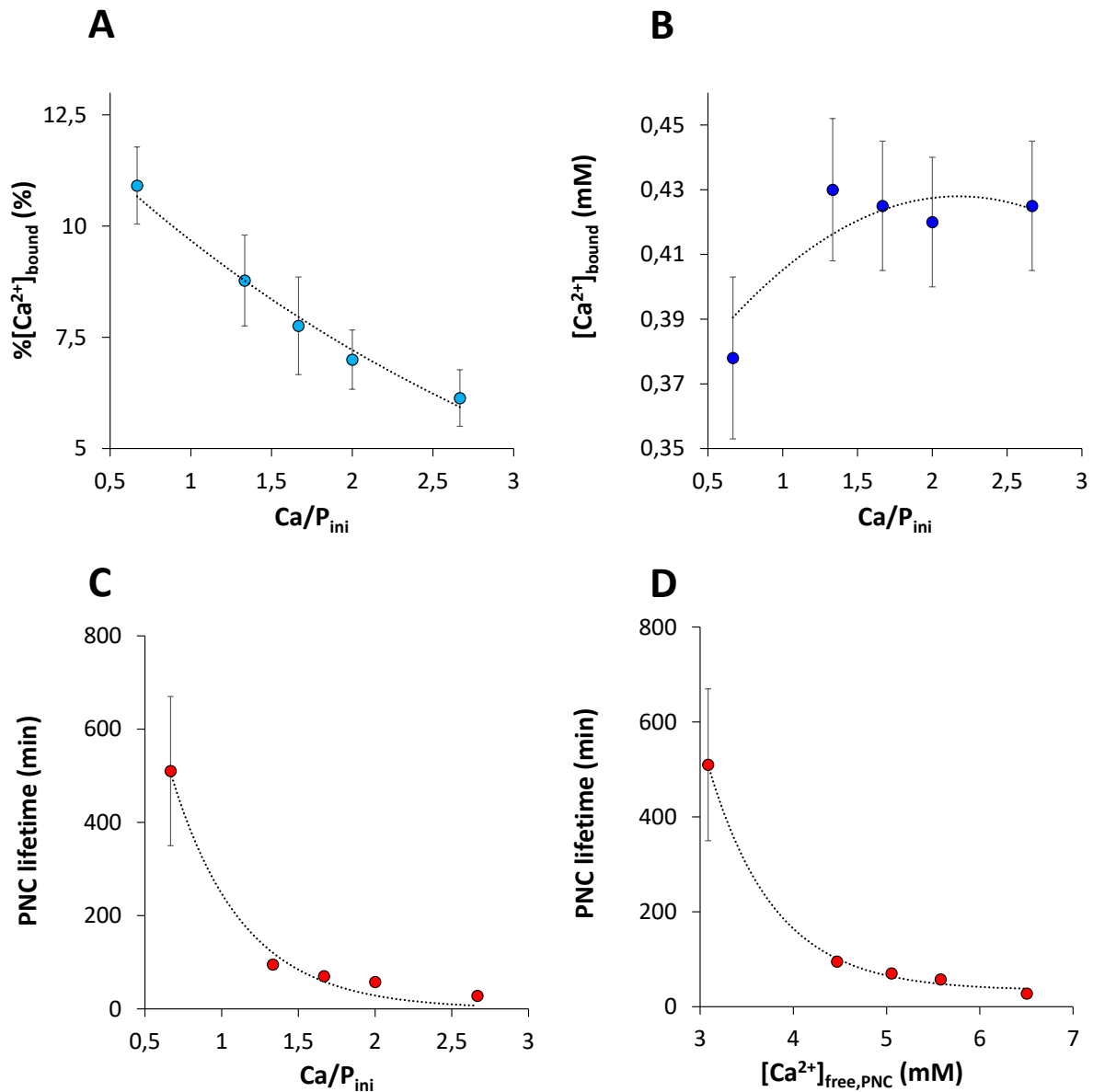


Figure 3 : (A) Bound Ca²⁺ ions relative proportions, (B) Bound Ca²⁺ ions absolute concentrations and (C) PNC lifetime time according to different Ca/P_{ini} ratios for the following mineralization condition: Ca×P_{ini} = 18 mM², pH 7.4, IS = 150 mM. (D) PNC lifetime exponential decay with remaining Ca²⁺ ions in solution.

This led us to perform *in-situ* quantitative ³¹P solution NMR to access to the phosphate concentration over time. **Figure 4A** displays a 2D map showing the evolution of the ³¹P signal chemical shift and intensity during precipitation (mineralization condition: Ca/P_{ini} = 1.67, Ca×P_{ini} = 18 mM², pH 7.4 and IS = 0.15 M). Nucleation and crystallization are controlled through the corresponding Ca-potentiometry experiment (**Fig 5B**).

During the prenucleation stage, a single resonance at 2.02 ppm is observed corresponding to free ions and bound phosphates inside PNC in a fast exchange regime (**Fig 4B**). After and during nucleation, distorted and broad ³¹P lineshapes are observed because the signal is shifting faster than acquisition (**Fig 4B**). During nucleation, the signal quickly shifts toward lower chemical shifts down to

~1.85 ppm and become much less intense due to the formation of a solid phase through PNC consumption (Fig 4A). Then during crystallization events, the ^{31}P signal slowly moves toward lower chemical shifts down to ~1.7 ppm and become slightly less intense overtime (Fig 4B). The drifting to lower ^{31}P chemical shift can also be in line with the observed pH decrease (Fig SI 7A).

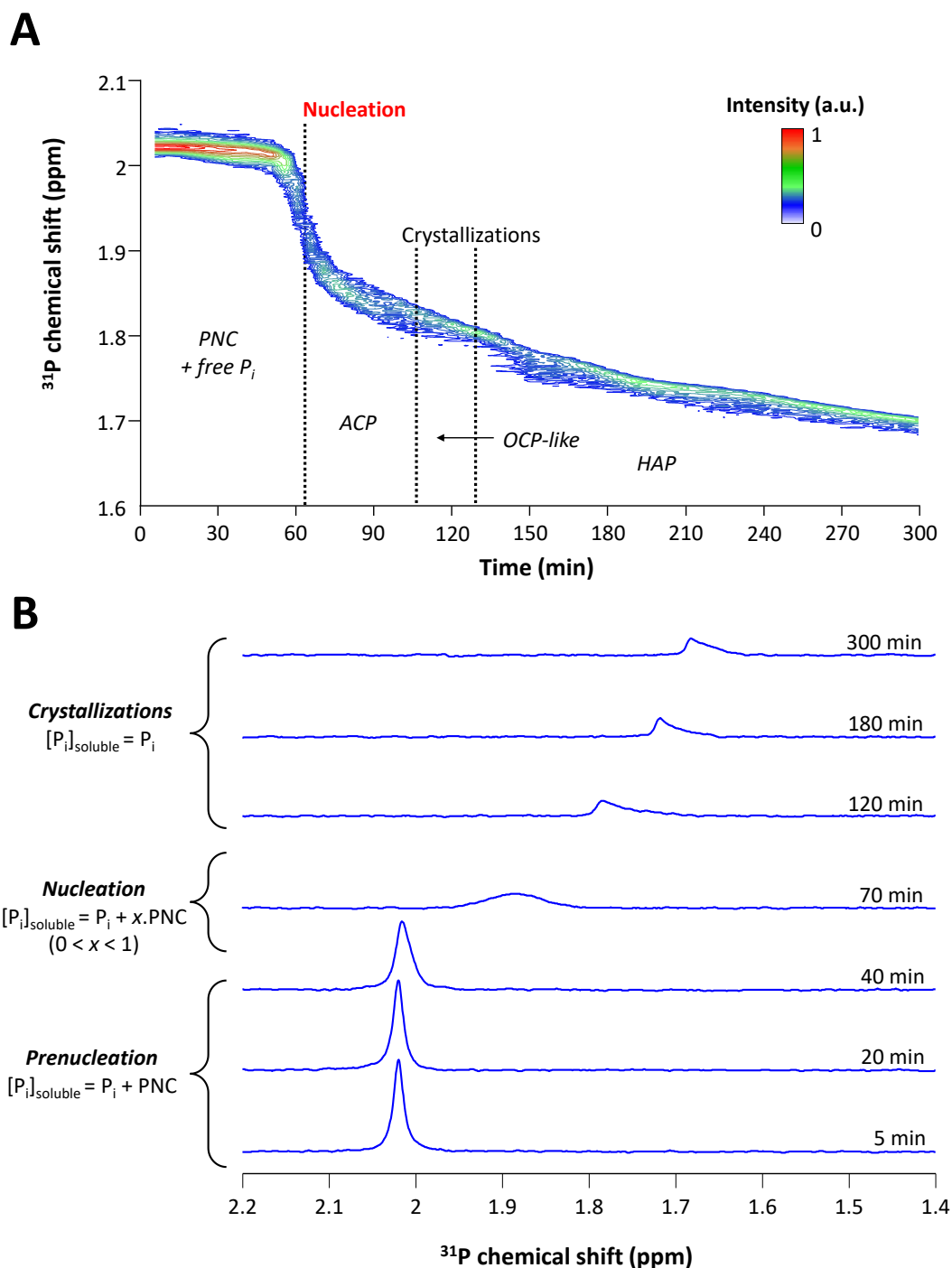


Figure 4: (A) Representative *in situ* ^{31}P solution NMR 2D map displaying signal evolution (chemical shift and intensity) and (B) ^{31}P selected spectra during prenucleation (5, 20 & 40 minutes), nucleation (70 min) and crystallization (120, 180 & 300 min) events during HAP formation (mineralization condition: $\text{Ca}/P_{\text{ini}} = 1.67$, $\text{Ca}xP_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$, pH 7.4, IS = 150 mM). Indicated domains in (A) are defined based on Ca-potentiometry experiment, see below (Fig 5B).

Only soluble species are detected in this experiment ($[P_i]_{\text{soluble}}$). Hence, after ^{31}P signal integration, the concentration of bound phosphate into solid phases ($[P_i]_{\text{solid}}$) can be determined as follows:

$$[P_i]_{\text{solid}} = [P_i]_{\text{initial}} - [P_i]_{\text{soluble}},$$

where $[P_i]_{\text{initial}}$ is the initial phosphate concentration for a given condition (**Fig 5A**). During prenucleation, we do not detect any $[P_i]$ variation. Then an uptake of phosphate is observed as $[P_i]_{\text{solid}}$ is suddenly increasing during nucleation (72% of $[P_i]_{\text{initial}}$). Then, a progressive increase of $[P_i]_{\text{solid}}$ was observed up to HAP crystallization. We can conclude that the highest phosphate consumption from solution is happening during ACP nucleation. The subsequent transformations only require a small amount of phosphate ions uptake. On the other hand, calcium potentiometry experiment exhibit successive and higher calcium uptakes during the formation of solid phases (**Fig 5B**). Thus, the successive events during HAP crystallization are mainly driven by an uptake of calcium ions over time, that could explain why nucleation occurs faster for an excess of calcium ions, rather than in excess of phosphate ions.

Furthermore, combining *in situ* ^{31}P solution NMR (**Fig 5A**) and calcium potentiometry (**Fig 5B**) data, we calculated the calcium-to-phosphate molar ratio of bonded species ($\text{Ca}/P_{\text{bound}}$), *i.e.* in PNC and solid phases (**Fig 5C**) based on $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}}$ and bound phosphate ions $[P_i]_{\text{bound}}$. For solid phases, we assume that $[P_i]_{\text{bound}} = [P_i]_{\text{solid}}$ as (i) no PNC was observed after nucleation through TEM observations and (ii) the strong chemical shift variation before and after nucleation (**Fig 4A**) suggest that the $P_i \leftrightarrow$ PNC exchange is stopped after nucleation (*i.e.* only free ions are detected). At the end of the mineralization reaction, $\text{Ca}/P_{\text{bound}}$ is found to be ~ 1.5 in agreement the formation of calcium-deficient HAP. During the intermediate events, $\text{Ca}/P_{\text{bound}}$ subsequently increases to ~ 0.67 and ~ 1.33 corresponding to different transient solid phases. These Ca/P values are in agreement with the previous study of Habraken *et al.*⁹ for which the authors assigned these intermediate phases to ACP and Ca-deficient OCP. However, calculating the $\text{Ca}/P_{\text{bound}}$ ratio in PNC requires to estimate the amount of bound phosphate in PNC $[P_i]_{\text{bound,PNC}}$ which is not directly detected through ^{31}P solution NMR.

Nonetheless, $[P_i]_{\text{bound,PNC}}$ is related to H^+ variation, *i.e.* pH variation during the prenucleation stage. We detected a small pH decreasing during prenucleation stage (**Fig SI 7A**), that we assume to be related to calcium ions binding with phosphate ions. We believe that in our conditions, Tris buffer is buffering the solution rather than phosphate ions because of its much higher concentrations (50 mM vs. 3.29 mM in this case, respectively). Therefore, calcium ions binding with HPO_4^{2-} and H_2PO_4^- initial speciation should not be detected through pH variation. In such conditions, pH variation during prenucleation stage can only be detected if calcium binding involves H_2PO_4^- deprotonation, *i.e.* initial phosphate speciation is not suitable to form PNC (39% H_2PO_4^- ; 61% HPO_4^{2-} at pH 7.4 and T_{room}). Hence, calcium ions tend to bind with several phosphate ions leading to (i) high amounts of bound phosphates inside PNC and (ii) negatively charged clusters (≤ -1). During nucleation, we detect both a Ca^{2+} (**Fig 5A**) and proton releasing (**Fig SI 7B**) in similar proportions leading to a +1-charge increase. Thus, detected $[P_i]_{\text{solid,ACP}}$ is likely arising from the prenucleation stage rather than nucleation. Therefore, Ca/P_{PNC} calculations during the prenucleation stage are based on the hypothesis that there is no phosphate uptake when PNC nucleate into ACP, *i.e.* $[P_i]_{\text{soluble,PNC}} = [P_i]_{\text{solid,ACP}}$ (= 1.64 mM for example below in **Fig 5**).

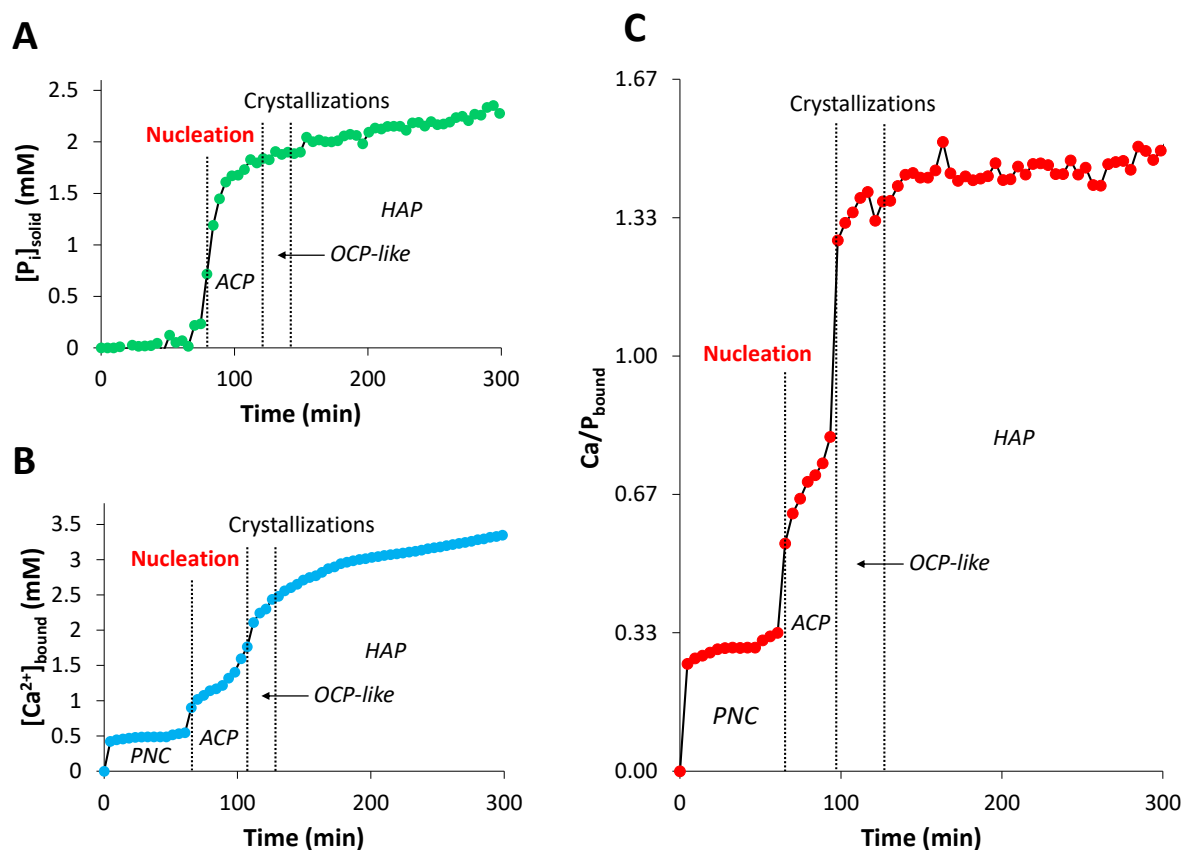


Figure 5 : (A) $[P_i]_{\text{solid}}$, (B) $[Ca^{2+}]_{\text{bound}}$ and (C) Ca/P_{bound} variation for the following mineralization condition: $Ca/P_{\text{ini}} = 1.67$, $Ca \times P_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$ (pH 7.4, IS = 150 mM).

This led us to calculate the Ca/P_{bound} ratio in PNC close to ~ 0.3 — 0.33 suggesting PNC are calcium triphosphate units. Such result is in accordance with previous studies where such Ca/P ratio were evaluated on the basis of mass and charge balances equations and calcium potentiometry⁹, molecular dynamics simulation²⁷ and ³¹P solution NMR and calcium potentiometry in SBF¹⁰. This suggests that the main phosphate uptake into bound species occur during the prenucleation stage. Same methodology was applied for two other mineralization conditions $Ca/P_{\text{ini}} = 0.67$, $Ca \times P_{\text{ini}} = 22 \text{ mM}^2$ (**Fig SI 8**) and $Ca/P_{\text{ini}} = 2.67$, $Ca \times P_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$ (pH 7.4, IS = 150 mM for both) (**Fig SI 9**). In these experiments, a similar Ca/P_{bound} of ~ 0.3 — 0.33 was observed during the prenucleation stage. Very interestingly, these results suggesting that PNC are calcium triphosphate units in our conditions, and this, no matter the initial Ca^{2+} and phosphate concentrations.

Influence of the ionic strength

To investigate the crowding effect in solution regarding PNC formation, variation of ionic strength was studied by adding various amounts of KCl at given Ca/P_{ini} ratio, $Ca \times P_{\text{ini}}$ product and an initial pH of 7.4. Herein we present the case of $Ca/P_{\text{ini}} = 1.67$ and $Ca \times P_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$ at pH 7.4. While IS increased from 0 to 300 mM, $\%[Ca^{2+}]_{\text{bound}}$ decreases from 13.1 to 6.7% (**Fig 6A**). On the other hand, induction times exponentially increased from less than 1 minute to 13 hours when KCl built up from 0 to 300 mM (**Fig 6B**). As previously illustrated, large proportion of PNC goes along with short lifetimes and reciprocally. In presence of IS = 300 mM, after 180 minutes of induction time (i.e. still into the

preneucleation stage) nanometric (1–2 nm) individual clusters are evidenced from cryo-TEM observation (**Fig 6C**). These individual clusters were found to aggregate into 100–200 nm higher-order structure, as observed in our previous study¹⁰. Therefore, high IS does not prevent PNC formation nor aggregation. It unambiguously appears that increasing the external ionic strength implies delaying effects on PNC formation and aggregation. Two reasons can explain this effect:

- Ionic strength crowds solution preventing calcium and phosphate ions to collide together by reducing their ionic mean free path.
- Spectator cations (which do not take part in PNC final structure) locally act as counter-ions to negative phosphate ions thus competing with proton exchanges described in (Eq 3). As PNC may form under H_2PO_4^- deprotonation upon binding of Ca^{2+} ions and HPO_4^{2-} ions, monovalent cations (here K^+) may act as a counter-ion thus blocking HPO_4^{2-} complexation site. In this scheme, counter-ions could locally be part of PNC structure for short periods (Fig 8B).

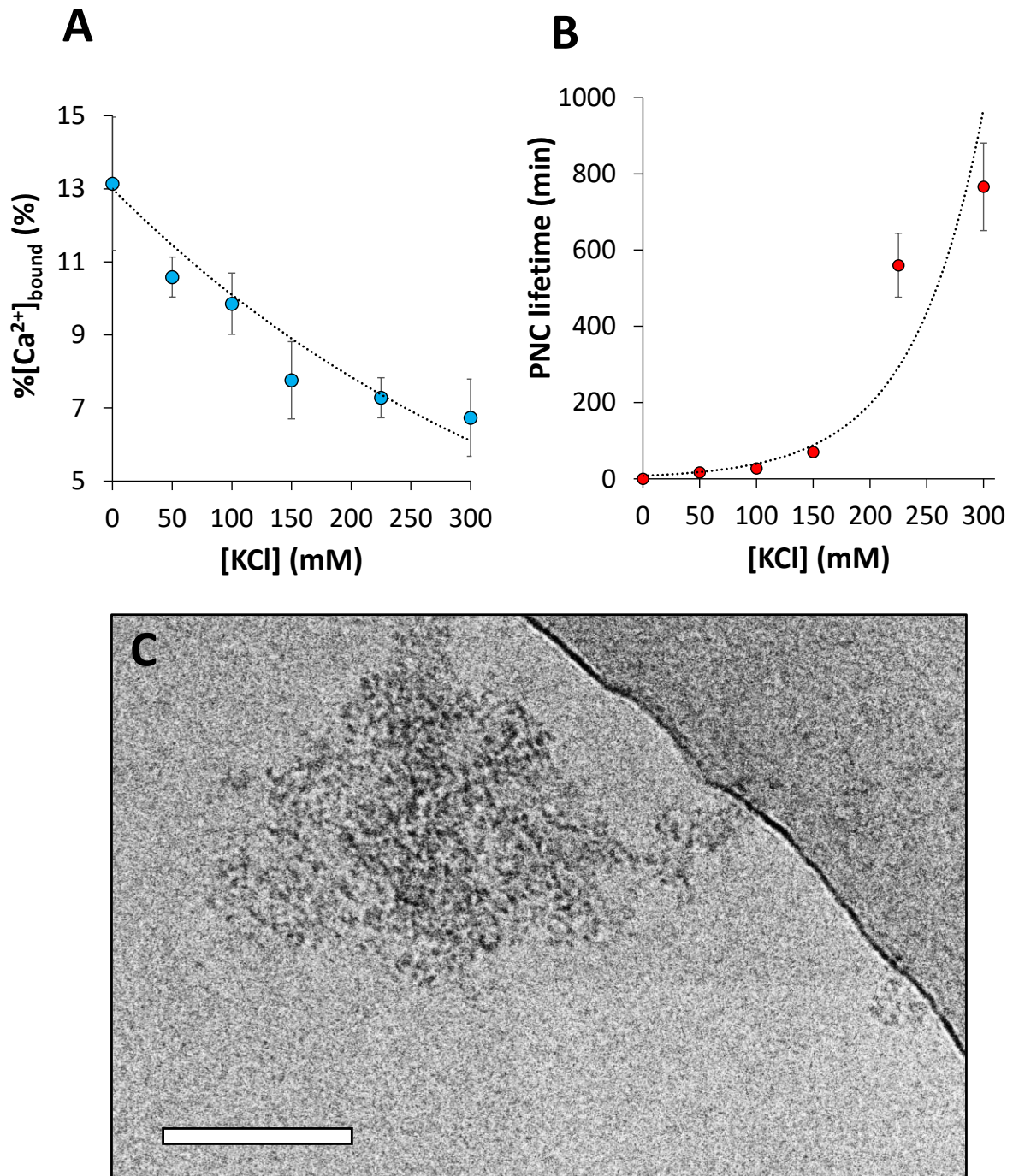


Figure 6 : (A) Bound Ca²⁺ relative proportions, (B) PNC lifetime according to different initial IS values and (C) cryo-TEM observation of calcium phosphate solution at IS = 300 mM for the following mineralization condition: Ca/P_{ini} = 1.67, Ca×P_{ini} = 18 mM² (pH 7.4). Solutions were quenched 180 minutes after mixing. Scalebars = 100 nm.

Influence of the pH

The role of phosphate ion protonation state was also investigated. Similar characterizations were performed by studying the impact of initial pH (*i.e.* initial phosphate speciation) onto PNC formation.

Here we detail the example of $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 2$ and $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$ ($\text{IS} = 150 \text{ mM}$). Increasing initial pH from 7.3 to 7.8 led to a uptake of $\%[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}}$ from 3.5 to 15.7%, **Fig 7A**). This can be interpreted as an increase of the PNC amount when increasing the overall proportion of HPO_4^{2-} ions. As seen previously, increasing PNC proportion also exponentially reduced precipitation time from more than 7 hours at pH 7.3 to 17 minutes at pH 7.7 (**Fig 7B**). Similar trends were observed for another mineralization condition ($\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 1.67$, $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$ and $\text{IS} = 150 \text{ mM}$) where $\%[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}}$ increased from 6.8 to 14.6% and PNC lifetime decreased from 142 to 7 min when initial pH rose from 7.3 to 7.7 (**Fig SI 10**).

Interestingly, conditions at pH 7.55, pH 7.6 and 7.7 unexpectedly became slightly opaque before the detected nucleation by Ca ion potentiometry. These precipitates appeared 12, 9 and 1 minutes before observing $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ drops with calcium potentiometry at initial pH of pH 7.7, 7.6, 7.55, respectively. Cryo-TEM observations at pH 7.55 (**Fig 7D**) and pH 7.7 (**Fig 7E**) revealed these early precipitates as dense nanometric aggregates (up to $\approx 20\text{--}30 \text{ nm}$ in size) of nanometric clusters coexisting with individual PNC, whereas only PNC were observed at pH 7.4 (**Fig 7C**). This first nucleation seems to be induced by solid postnucleation clusters that are $1.5\text{--}3 \text{ nm}$ in size (**Fig SI 11A**). Both solid and soluble clusters evolves toward larger spherical aggregates, presumably ACP⁹, that are also composed of solid clusters (**Fig SI 11B**).

These observations suggest that PNC can coexist with solid nanometric clusters before nucleation is detected through Ca-potentiometry at high pH values. When occurring, no noticeable calcium uptake is noticed, hence suggesting solid nanometric clusters directly form from PNC. We believe such solid cluster is forming ACP as similar clusters were found in spherical aggregates after detected nucleation. This also suggests that bound phosphates amount remain constant before (*ie.* PNC) and after precipitating in ACP. Similar early precipitates were also observed for high absolute concentrations (typically $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}} = 26 \text{ mM}^2$) and low ionic strengths ($\text{IS} \leq 50 \text{ mM}$).

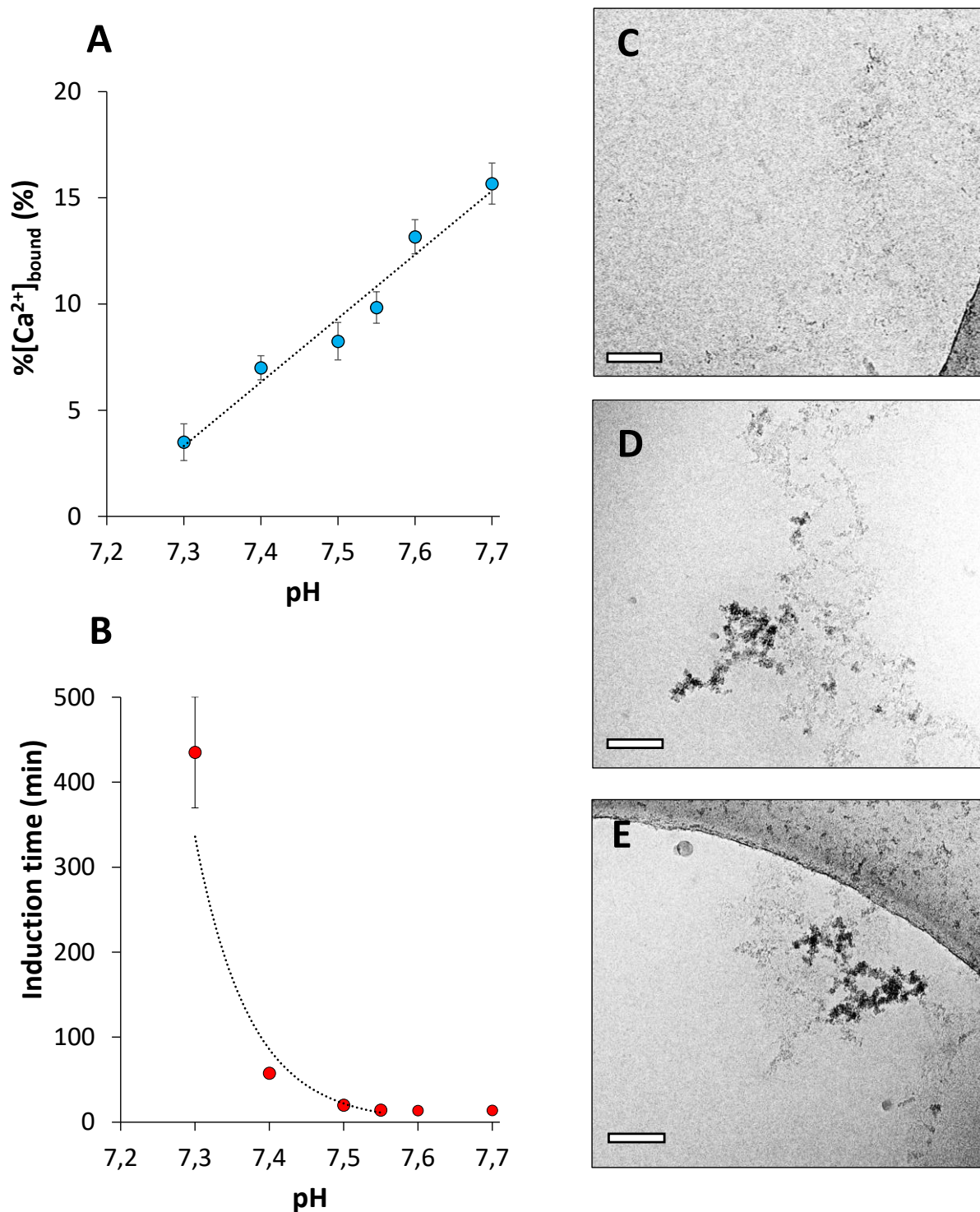


Figure 7 : (A) Bound Ca²⁺ relative proportions, (B) PNC lifetime according to different initial pH values and (C) cryo-TEM observations of calcium phosphate solutions at (D) pH 7.4 ; (E) pH 7.55 ; (F) pH 7.7 for the following mineralization condition: Ca/P_{ini} = 2, CaxP_{ini} = 18 mM² (IS = 150 mM). Solutions were quenched 3 minutes after mixing *i.e.* before apparent nucleation but before nucleation was observed onto Ca-potentiometry experiments for solutions at pH 7.55 and 7.7. Scalebars = 100 nm.

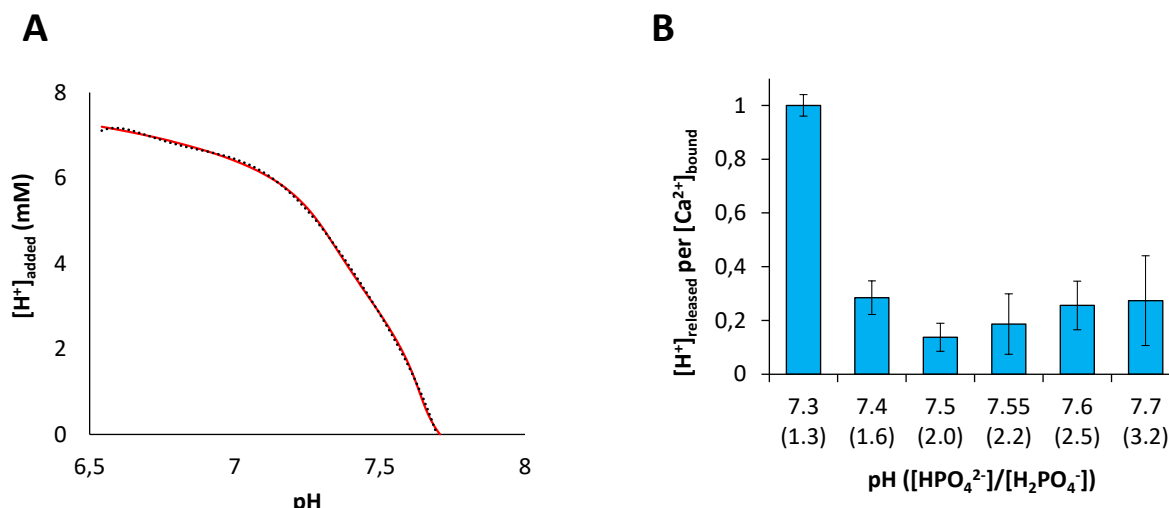
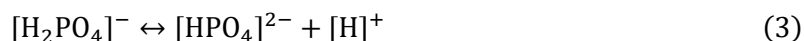


Figure 8: Measurement of pH upon controlled addition of [HCl] 1M solution into a Tris-buffered phosphate solution at pH 7.4 containing 150 mM of KCl (red line). Data were fitted to a polynomial function (black dotted line) to empirically modelize $[H^+]$ concentration based on pH variations (A). $[H^+]_{\text{released}}$ per bound calcium $[Ca^{2+}]_{\text{bound}}$ during PNC formation for different initial pH. Below pH values are denoted corresponding phosphate protonation states denoted as $[HPO_4^{2-}]/[H_2PO_4^-]$ ratios onto x axis.

To know more about these concomitant soluble and solid clusters, we looked pH variation into more details. To do so, we measured pH variations adding known amounts of HCl in a reference solution (Tris 50 mM, $[P_i]=5$ mM, pH = 7.7, KCl = 150 mM) until reaching pH 6.6 to cover all the pH range of interest. Variations were empirically modeled using a polynomial model (**Fig 8A**) to track proton releasing $[H^+]_{\text{released}}$ based on pH measurements during mineralization. Example of $[H^+]_{\text{released}}$ determination is shown in **Fig SI 12** for the mineralization condition $Ca/P_{\text{ini}} = 2$, $Ca \times P_{\text{ini}} = 18$ mM² ($IS = 150$ mM) at pH 7.55. First, pH variation during prenucleation (after mixing and before nucleation) is measured (**Fig SI 12A**) here as $\Delta pH = 0.009$. This value is then applied to the polynomial model to determine $[H^+]_{\text{released}} \approx 0.11$ mM (**Fig SI 12B**). $[H^+]_{\text{released}}$ per bound calcium $[Ca^{2+}]_{\text{bound}}$ is calculated as the ratio of $[H^+]_{\text{released}}$ to $[Ca^{2+}]_{\text{bound}}$ (**Fig 8B**).

From the pH variation curves recorded at define initial pH values (**Fig SI 13**), we calculated protons released upon PNC formation $[H^+]_{\text{released}}$ per $[Ca^{2+}]_{\text{bound}}$ measuring pH decay during the prenucleation stage right after mixing (**Fig 8B**). These calculation may be interpreted qualitatively as $[H^+]_{\text{released}}$ is calculated from ΔpH whose determination relies on the choice of initial pH. Interestingly, we found this proton variation to be minimal at pH 7.5, (*i.e.* initial $[HPO_4^{2-}]/[H_2PO_4^-]$ ratio of ~ 2). In other words, phosphate speciation inside PNC was found to be the closest to the ionic pool at pH 7.5. This experiment strengthens the hypothesis of PNC being calcium triphosphate units with the following phosphate speciation $[Ca(HPO_4)_2(H_2PO_4)]^{3-}$. While this composition is in agreement with in previous studies^{9,10}, this trend suggest that PNC speciation is constant no matter what pH value initial value. This explains why more protons are released in solution at lower pH values due to a specific capture of HPO_4^{2-} instead of $H_2PO_4^-$ according to (3), whereas proton release at higher pH values is due to concomitant PNC formation and kinetically favored ACP nucleation. This PNC—ACP duality was also observed as an early apparent precipitation at higher initial concentrations and lower ionic strength at pH 7.4. Hence, this suggests that ACP solid clusters can coexist with PNC if Ca^{2+} and HPO_4^{2-} ions have

enough probabilities to collide in a 2/3 ratio. Just like for PNC formation, ACP nucleation thus relies on both ionic mean free paths (*ie.* ionic strength, absolute concentrations) and absolute content of HPO_4^{2-} ion (*ie.* pH).



Conclusion

Our results show that PNC formation may be affected both kinetically and quantitatively by small variations of calcium and phosphate concentrations, pH or ionic strength under biological-like conditions. Through total concentration variations, it clearly appears that PNC formation and aggregation are ruled by standard concepts of ionic collisions in solution triggering ion binding (formation) and H-bonding, likely (aggregation). Consequently, high amounts of PNC present relatively short lifetimes whereas low concentrations of PNC remained stable for longer periods. However, PNC lifetime does not rely only on PNC amount as increasing the remaining calcium ions in solution seemed to accelerate precipitation at lower PNC amounts. In particular, the higher PNC concentration was in solution, the shorter their lifetime, following an exponential decay trend (**Fig 9A**). Relative concentrations and ionic strengths variations underline the ionic pool significance for PNC formation and aggregation (**Fig 9B**), by setting-up the ionic mean free path. More generally, we reckon that we have to take into account the ionic pool to study transient species evolving over time such as PNC. Initial phosphate speciation from the ionic pool was found to be similar to phosphate inside PNC at pH 7.5. Furthermore, we claim that bound phosphate inside PNC and ACP is quite similar based on *in situ* Ca/P measurements. Going along with calculated $\text{Ca}/\text{P}_{\text{PNC}} \sim 0.33$, we provide experimental evidences suggesting the composition of PNC as calcium triphosphate units $[\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)]^{3-}$ remained unchanged in the range of our conditions no matter the pH or initial concentrations. In this study, relative amounts of bound calcium and phosphate are listed as functions of some, but non-exhaustive, initial parameters. These can analogically be interpreted for *in-vivo* systems (*ie.* living organisms) in which mineralizing proteins could locally change concentrations and pH to control bone mineralization and regulation.

From a fundamental understanding point of view, this study provides experimental data for early stages of hydroxyapatite nucleation. This work can be used as a guideline to collect more data based on perform comparative techniques such as NMR or FTIR in which PNC and free ions would have similar environments, thus being hard to distinguish. In such a way, initial conditions must be carefully chosen in order to set a compromise between PNC concentrations and lifetime according to the timescale of the experiment. Coupled with simulations, our data might be useful to furtherly build a model and better apprehend prenucleation events. Furthermore, the same methodology can be applied to better understand similar systems undergoing non-classical mechanism of nucleation (*ie.* calcium carbonates, iron oxides, amino acids...).

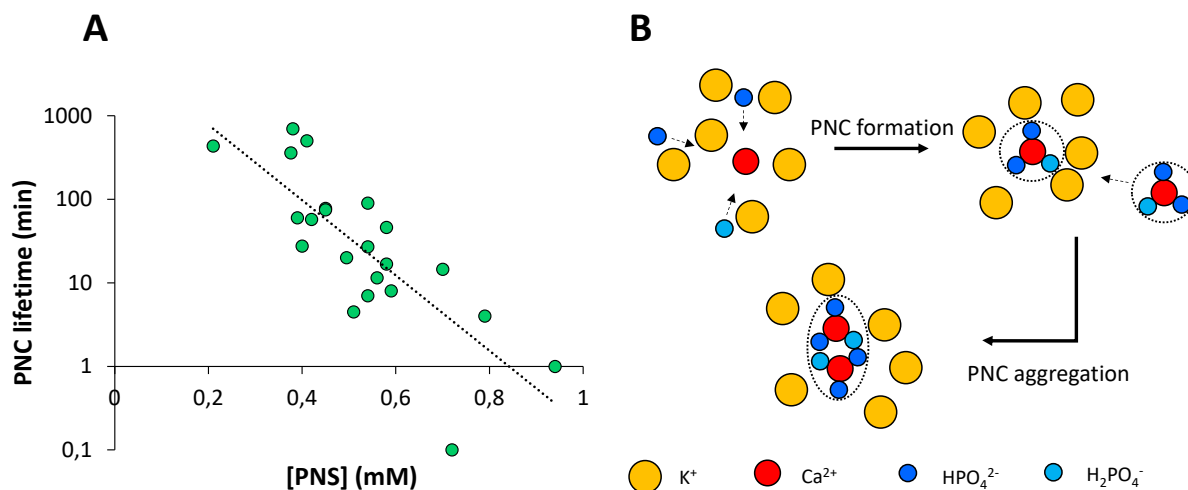


Figure 9 : (A) Exponential decay relationship between PNC amount and lifetime. Data were collected from all investigated conditions. (B) Outline of PNC formation and aggregation at pH 7.5 in presence of K^+ as crowding counter-ion. Dotted arrows exhibit P_i and PNC means free path.

References

- (1) Zapanta LeGeros, R. Apatites in Biological Systems. *Prog. Cryst. Growth Charact.* 1981, 4 (1), 1–45. [https://doi.org/10.1016/0146-3535\(81\)90046-0](https://doi.org/10.1016/0146-3535(81)90046-0).
- (2) Legros, R.; Balmain, N.; Bonel, G. Age-Related Changes in Mineral of Rat and Bovine Cortical Bone. *Calcif. Tissue Int.* 1987, 41 (3), 137–144. <https://doi.org/10.1007/BF02563793>.
- (3) Pasteris, J.; Wopenka, B.; Valsami-Jones, E. Bone and Tooth Mineralization: Why Apatite? *Elements* 2008, 4 (2), 97–104. <https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.4.2.97>.
- (4) Leventouri, T.; Antonakos, A.; Kyriacou, A.; Venturelli, R.; Liarokapis, E.; Perdikatsis, V. Crystal Structure Studies of Human Dental Apatite as a Function of Age. *Int. J. Biomater.* 2009, 2009, e698547. <https://doi.org/10.1155/2009/698547>.
- (5) Kim, H. M.; Rey, C.; Glimcher, M. J. Isolation of Calcium-Phosphate Crystals of Bone by Non-Aqueous Methods at Low Temperature. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 1995, 10 (10), 1589–1601. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650101021>.
- (6) Wang, Y.; Von Euw, S.; Fernandes, F. M.; Cassaignon, S.; Selmane, M.; Laurent, G.; Pehau-Arnaudet, G.; Coelho, C.; Bonhomme-Coury, L.; Giraud-Guille, M.-M.; Babonneau, F.; Azaïs, T.; Nassif, N. Water-Mediated Structuring of Bone Apatite. *Nat. Mater.* 2013, 12 (12), 1144–1153. <https://doi.org/10.1038/nmat3787>.
- (7) Von Euw, S.; Ajili, W.; Chan-Chang, T.-H.-C.; Delices, A.; Laurent, G.; Babonneau, F.; Nassif, N.; Azaïs, T. Amorphous Surface Layer versus Transient Amorphous Precursor Phase in Bone – A Case Study Investigated by Solid-State NMR Spectroscopy. *Acta Biomater.* 2017, 59, 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.040>.
- (8) Dey, A.; Bomans, P. H. H.; Müller, F. A.; Will, J.; Frederik, P. M.; With, G. de; Sommerdijk, N. A. J. M. The Role of Prenucleation Clusters in Surface-Induced Calcium Phosphate Crystallization. *Nat. Mater.* 2010, 9 (12), 1010–1014. <https://doi.org/10.1038/nmat2900>.

- (9) Habraken, W. J. E. M.; Tao, J.; Brylka, L. J.; Friedrich, H.; Bertinetti, L.; Schenk, A. S.; Verch, A.; Dmitrovic, V.; Bomans, P. H. H.; Frederik, P. M.; Laven, J.; Schoot, P. van der; Aichmayer, B.; With, G. de; DeYoreo, J. J.; Sommerdijk, N. A. J. M. Ion-Association Complexes Unite Classical and Non-Classical Theories for the Biomimetic Nucleation of Calcium Phosphate. *Nat. Commun.* 2013, 4 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms2490>.
- (10) Epasto, L. M.; Georges, T.; Selimović, A.; Guigner, J.-M.; Azaïs, T.; Kurzbach, D. Formation and Evolution of Nanoscale Calcium Phosphate Precursors under Biomimetic Conditions. *Anal. Chem.* 2021, 93 (29), 10204–10211. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01561>.
- (11) Gebauer, D.; Völkel, A.; Cölfen, H. Stable Prenucleation Calcium Carbonate Clusters. *Science* 2008, 322 (5909), 1819–1822. <https://doi.org/10.1126/science.1164271>.
- (12) Pouget, E. M.; Bomans, P. H. H.; Goos, J. A. C. M.; Frederik, P. M.; With, G. de; Sommerdijk, N. A. J. M. The Initial Stages of Template-Controlled CaCO₃ Formation Revealed by Cryo-TEM. *Science* 2009, 323 (5920), 1455–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1169434>.
- (13) Demichelis, R.; Raiteri, P.; Gale, J. D.; Quigley, D.; Gebauer, D. Stable Prenucleation Mineral Clusters Are Liquid-like Ionic Polymers. *Nat. Commun.* 2011, 2 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms1604>.
- (14) Ramnarain, V.; Georges, T.; Ortiz Peña, N.; Ihiawakrim, D.; Longuinho, M.; Bulou, H.; Gervais, C.; Sanchez, C.; Azaïs, T.; Ersen, O. Monitoring of CaCO₃ Nanoscale Structuration through Real-Time Liquid Phase Transmission Electron Microscopy and Hyperpolarized NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 2022, 144 (33), 15236–15251. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c05731>.
- (15) Ruiz-Agudo, E.; Burgos-Cara, A.; Ruiz-Agudo, C.; Ibañez-Velasco, A.; Cölfen, H.; Rodríguez-Navarro, C. A Non-Classical View on Calcium Oxalate Precipitation and the Role of Citrate. *Nat. Commun.* 2017, 8 (1), 768. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00756-5>.
- (16) Díaz-Soler, F.; Rodríguez-Navarro, C.; Ruiz-Agudo, E.; Neira-Carrillo, A. Stabilization of Calcium Oxalate Precursors during the Pre- and Post-Nucleation Stages with Poly(Acrylic Acid). *Nanomaterials* 2021, 11 (1), 235. <https://doi.org/10.3390/nano11010235>.
- (17) Baumgartner, J.; Dey, A.; Bomans, P. H. H.; Le Coadou, C.; Fratzl, P.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Faivre, D. Nucleation and Growth of Magnetite from Solution. *Nat. Mater.* 2013, 12 (4), 310–314. <https://doi.org/10.1038/nmat3558>.
- (18) Murphy, P. J.; Posner, A. M.; Quirk, J. P. Characterization of Partially Neutralized Ferric Nitrate Solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 1976, 56 (2), 270–283. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(76\)90253-8](https://doi.org/10.1016/0021-9797(76)90253-8).
- (19) Dousma, J.; de Bruyn, P. L. Hydrolysis—Precipitation Studies of Iron Solutions. II. Aging Studies and the Model for Precipitation from Fe(III) Nitrate Solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 1978, 64 (1), 154–170. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(78\)90345-4](https://doi.org/10.1016/0021-9797(78)90345-4).
- (20) Sjöberg, S. Silica in Aqueous Environments. *J. Non-Cryst. Solids* 1996, 196, 51–57. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(95\)00562-5](https://doi.org/10.1016/0022-3093(95)00562-5).
- (21) Sjöberg, S.; Öhman, L.-O.; Ingri, N.; Andersen, L.; Lindqvist, O.; Zemlicka, M. Equilibrium and Structural Studies of Silicon(IV) and Aluminium(III) in Aqueous Solution. 11. Polysilicate Formation in Alkaline Aqueous Solution. A Combined Potentiometric and ²⁹Si NMR Study. *Acta Chem. Scand.* 1985, 39a, 93–107. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.39a-0093>.
- (22) Svensson, I. L.; Sjöberg, S.; Öhman, L.-O. Polysilicate Equilibria in Concentrated Sodium Silicate Solutions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* 1986, 82 (12), 3635–3646. <https://doi.org/10.1039/F19868203635>.

- (23) Kellermeier, M.; Rosenberg, R.; Moise, A.; Anders, U.; Przybylski, M.; Cölfen, H. Amino Acids Form Prenucleation Clusters: ESI-MS as a Fast Detection Method in Comparison to Analytical Ultracentrifugation. *Faraday Discuss.* 2013, 159 (0), 23–45. <https://doi.org/10.1039/C2FD20060K>.
- (24) Hamad, S.; Hughes, C. E.; Catlow, C. R. A.; Harris, K. D. M. Clustering of Glycine Molecules in Aqueous Solution Studied by Molecular Dynamics Simulation. *J. Phys. Chem. B* 2008, 112 (24), 7280–7288. <https://doi.org/10.1021/jp711271z>.
- (25) Hagemeyer, D.; Ruesing, J.; Fenske, T.; Klein, H.-W.; Schmuck, C.; Schrader, W.; Piedade, M. E. M. da; Epple, M. Direct Experimental Observation of the Aggregation of α -Amino Acids into 100–200 Nm Clusters in Aqueous Solution. *RSC Adv.* 2012, 2 (11), 4690–4696. <https://doi.org/10.1039/C2RA01352E>.
- (26) Betts, F.; Posner, A. S. An X-Ray Radial Distribution Study of Amorphous Calcium Phosphate. *Mater. Res. Bull.* 1974, 9 (3), 353–360. [https://doi.org/10.1016/0025-5408\(74\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0025-5408(74)90087-7).
- (27) Mancardi, G.; Terranova, U.; de Leeuw, N. H. Calcium Phosphate Prenucleation Complexes in Water by Means of Ab Initio Molecular Dynamics Simulations. *Cryst. Growth Des.* 2016, 16 (6), 3353–3358. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00327>.
- (28) Garcia, N. A.; Malini, R. I.; Freeman, C. L.; Demichelis, R.; Raiteri, P.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Harding, J. H.; Gale, J. D. Simulation of Calcium Phosphate Prenucleation Clusters in Aqueous Solution: Association beyond Ion Pairing. *Cryst. Growth Des.* 2019, 19 (11), 6422–6430. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00889>.
- (29) Weber, E. M. M.; Kress, T.; Abergel, D.; Sewsrn, S.; Azaïs, T.; Kurzbach, D. Assessing the Onset of Calcium Phosphate Nucleation by Hyperpolarized Real-Time NMR. *Anal. Chem.* 2020, 92 (11), 7666–7673. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00516>.
- (30) Termine, J. D.; Posner, A. S. Calcium Phosphate Formation in Vitro: I. Factors Affecting Initial Phase Separation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, 140 (2), 307–317. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90071-8).
- (31) Termine, J. D.; Peckauskas, R. A.; Posner, A. S. Calcium Phosphate Formation in Vitro: II. Effects of Environment on Amorphous-Crystalline Transformation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, 140 (2), 318–325. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90072-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90072-X).
- (32) Yan, F.-W.; Zhang, S.-F.; Guo, C.-Y.; Zhang, X.-H.; Chen, G.; Yan, F.; Yuan, G.-Q. Influence of Stirring Speed on the Crystallization of Calcium Carbonate. *Cryst. Res. Technol. - CRYST RES TECH* 2009, 44, 725–728. <https://doi.org/10.1002/crat.200900190>.
- (33) Rothwell, W. P.; Waugh, J. S.; Yesinowski, J. P. High-Resolution Variable-Temperature Phosphorus-31 NMR of Solid Calcium Phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* 1980, 102 (8), 2637–2643. <https://doi.org/10.1021/ja00528a020>.
- (34) Jäger, C.; Welzel, T.; Meyer-Zaika, W.; Epple, M. A Solid-State NMR Investigation of the Structure of Nanocrystalline Hydroxyapatite. *Magn. Reson. Chem. MRC* 2006, 44 (6), 573–580. <https://doi.org/10.1002/mrc.1774>.
- (35) Pan, Y.; Fleet, M. E. Compositions of the Apatite-Group Minerals: Substitution Mechanisms and Controlling Factors. *Rev. Mineral. Geochem.* 2002, 48 (1), 13–49. <https://doi.org/10.2138/rmg.2002.48.2>.

Supplement Information

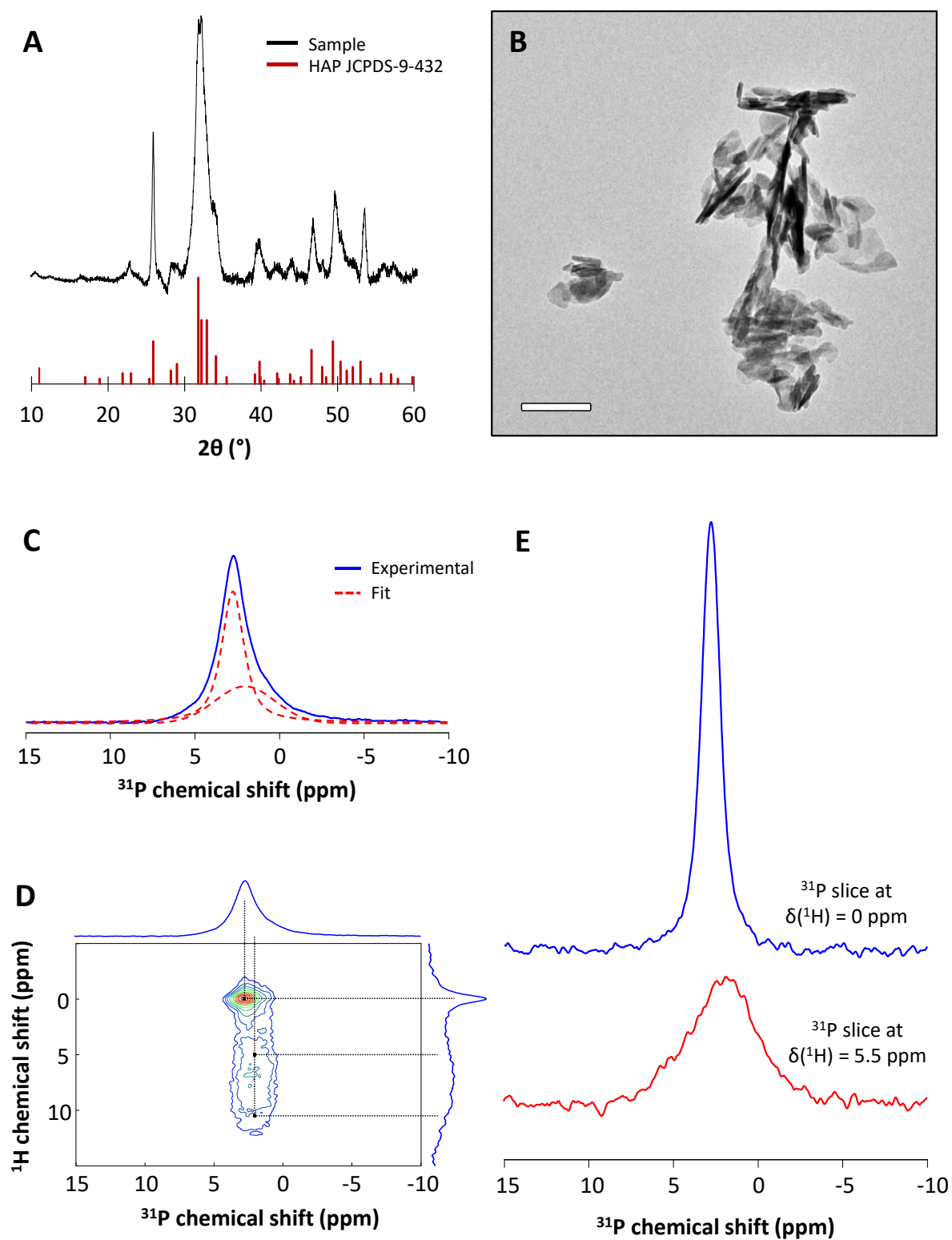


Figure SI 1 : Characterization of final particle phases after aging and lyophilization. (A) XRD pattern (and JCPDS-9-432 file corresponding to pure hydroxyapatite), (B) TEM micrograph (Scalebar = 100 nm), (C) Solid-state NMR ^{31}P direct excitation and (D) ^{31}P - ^1H heteronuclear correlation.

Deconvolution of the 1D spectra exhibits 2 resonances (red dotted lines) corresponding to crystalline hydroxyapatite and amorphous calcium phosphate. Respective correlations with protons were directly marked on the 2D correlation map (black cross-lines). (E) ^{31}P slices extracted at $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm (blue, top) and $\delta(^1\text{H}) = 5.5$ ppm (red, bottom).

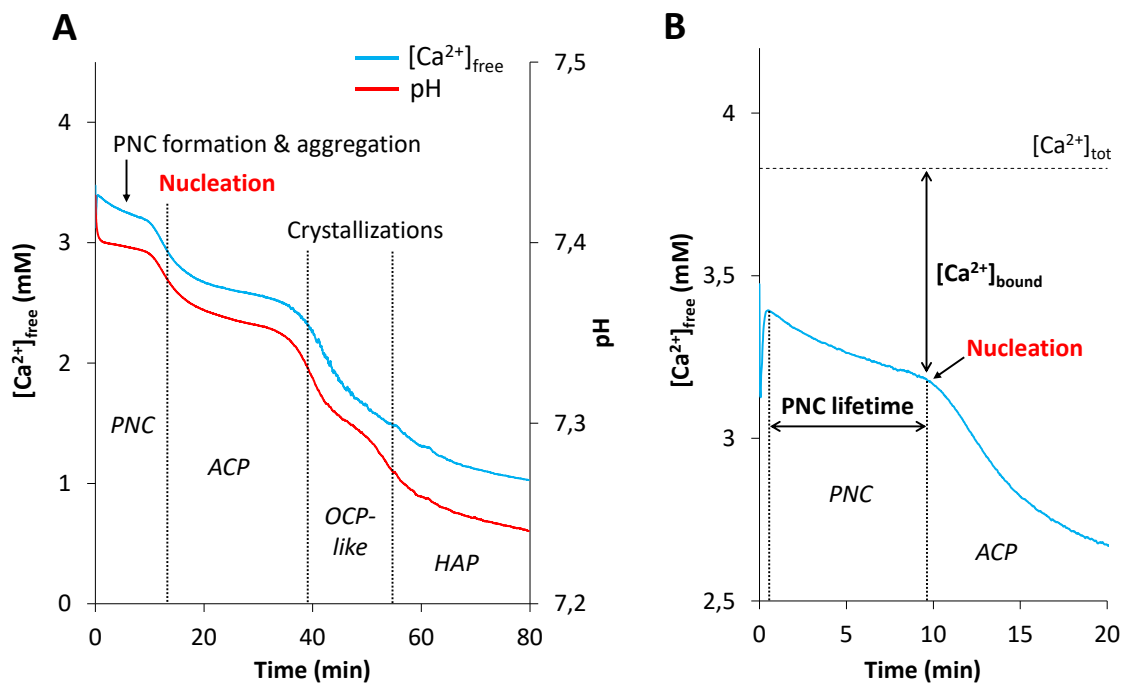


Figure SI 2: Representative example of calcium (blue line) and pH (red line) potentiometry monitoring of calcium phosphate mineralization reaction. (B) Determination of bound calcium concentration inside PNC $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}}$, and PNC lifetime using Ca-potentiometry. Mineralization conditions: $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 0,67$, $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}} = 22 \text{ mM}^2$, pH 7.4, IS = 150 mM.

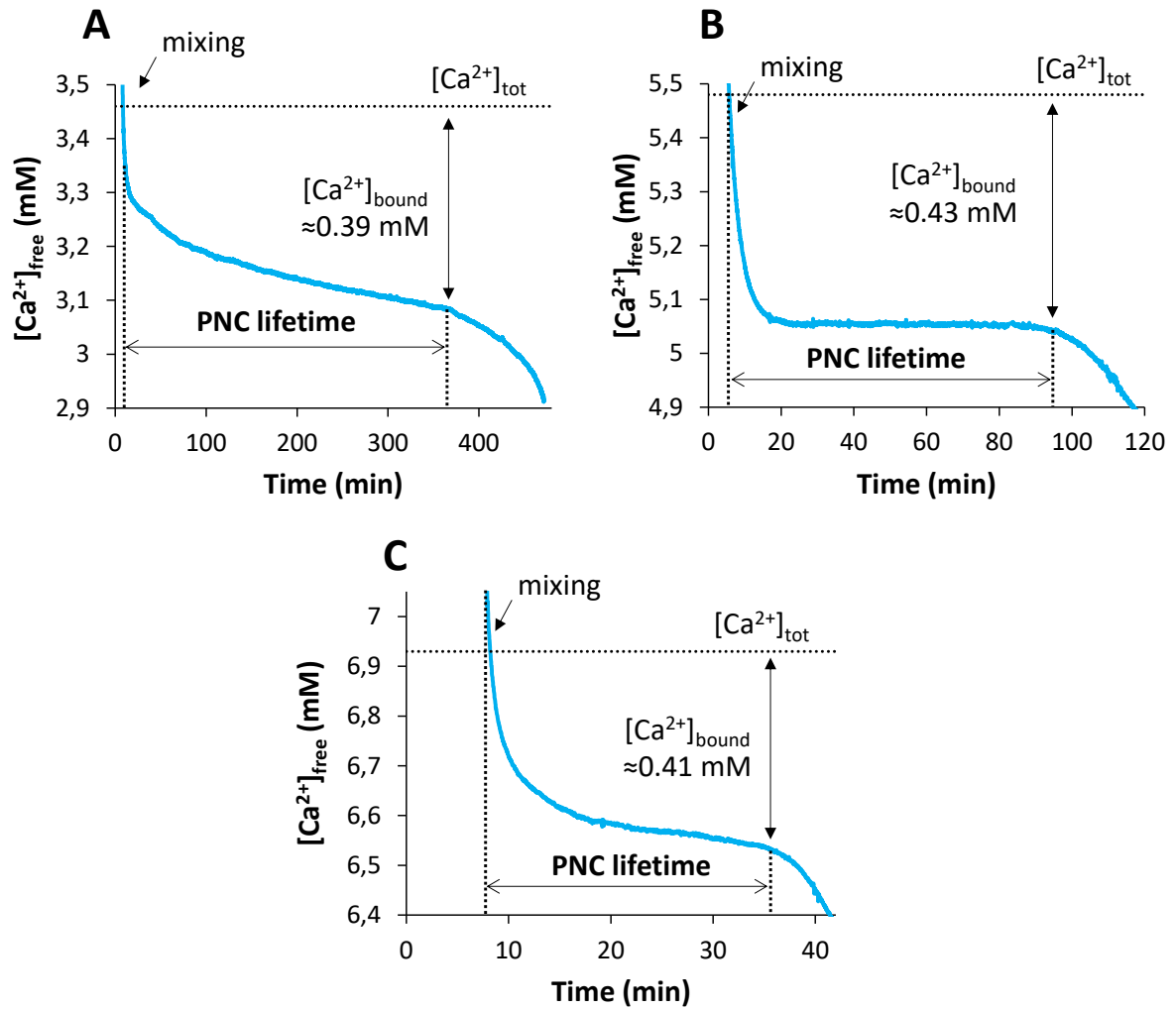


Figure SI 3: Determination of $[Ca^{2+}]_{bound}$ and induction time in calcium phosphate solutions. Mineralization conditions ($Ca \times P_{ini} = 22 \text{ mM}^2$, pH 7.4, IS = 150 mM) : (A) $Ca/P_{ini} = 0,67$, (B) $Ca/P_{ini} = 1,33$ and (C) 1.67.

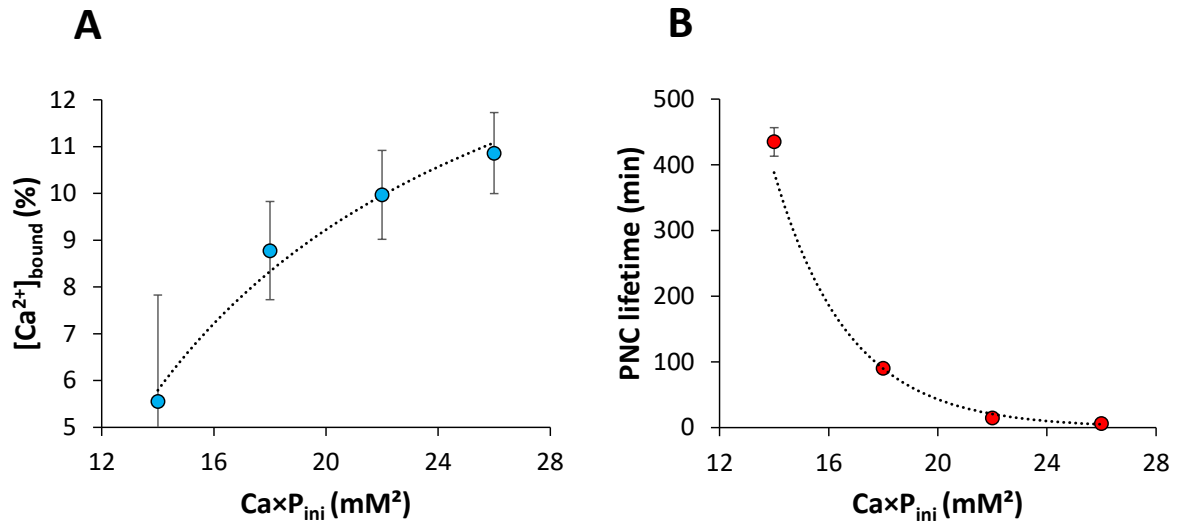


Figure SI 4 : (A) Bound Ca^{2+} relative proportions and (B) induction time according to different $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}}$ products for the following mineralization condition: $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 1.33$, pH 7.4, IS = 150 mM.

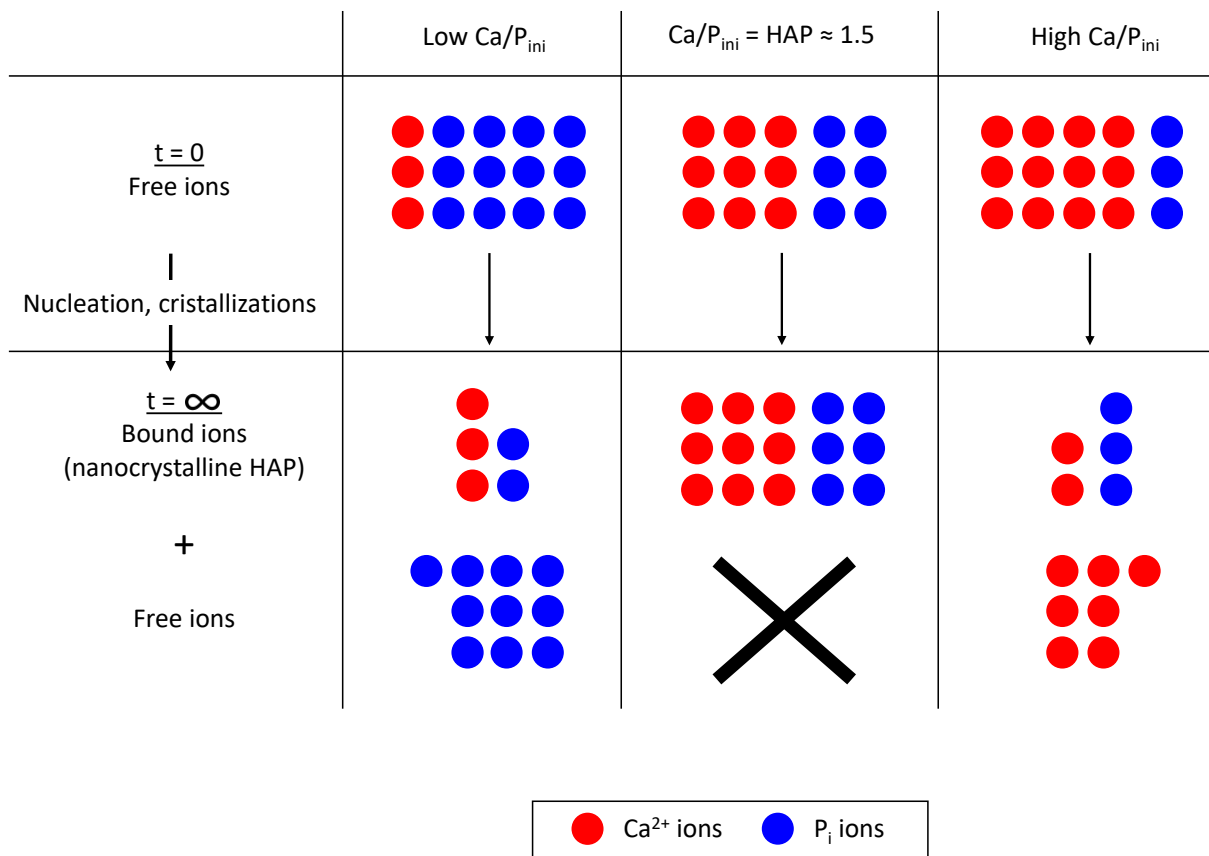


Figure SI 5 : Representation of $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ influence onto theoretical ionic partition after crystallization. When $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ is close to 1.5, all ions *in fine* converts into nanocrystalline HAP thus forming higher amount of PNC. When $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}}$ is lower or higher, HAP crystallization (hence PNC formation), is limited because of lower calcium or phosphate ions, respectively.

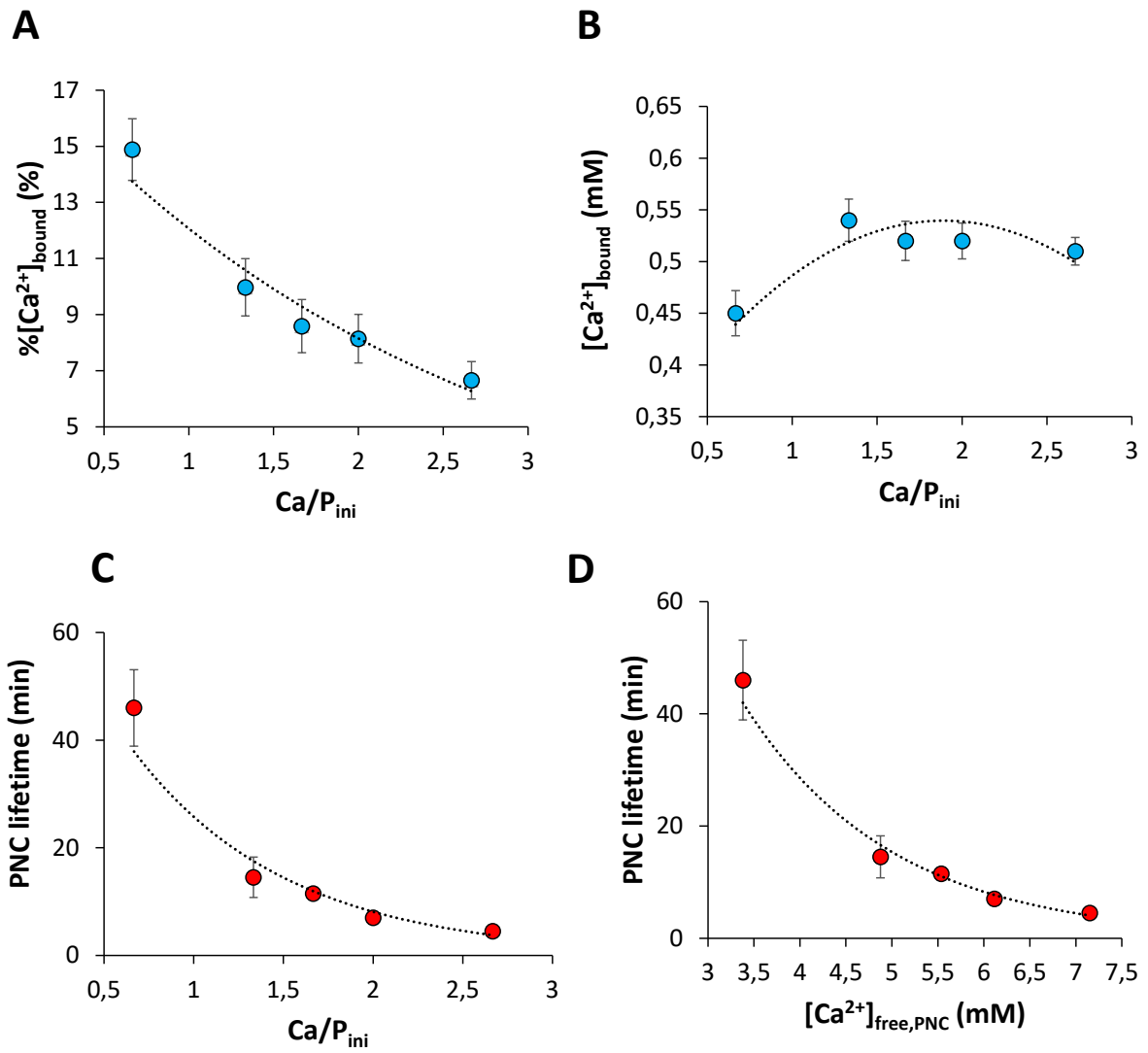


Figure SI 6 : (A) Bound Ca²⁺ ions relative proportions, (B) Bound Ca²⁺ ions absolute concentrations and (C) PNC lifetime time according to different Ca/P products for the following mineralization condition: $C_xP_{ini} = 22 \text{ mM}^2$, pH 7.4, IS = 150 mM. (D) PNC lifetime exponential decay with remaining Ca²⁺ ions in solution.

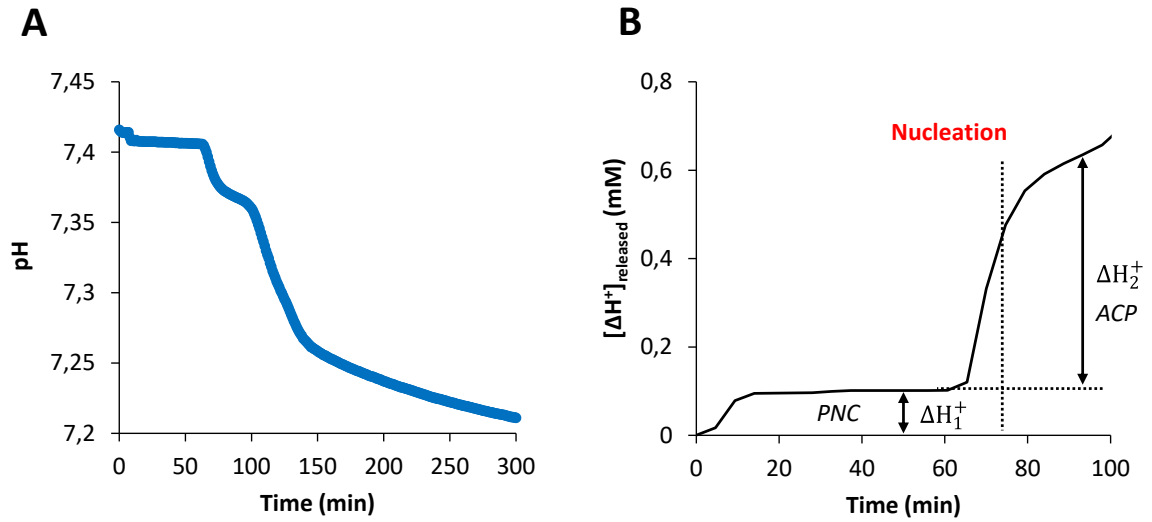


Figure SI 7: (A) pH and (B) Proton release variations during the following mineralization condition: $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 1.67$, $\text{CaxP}_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$ (pH 7.4, IS = 150 mM).

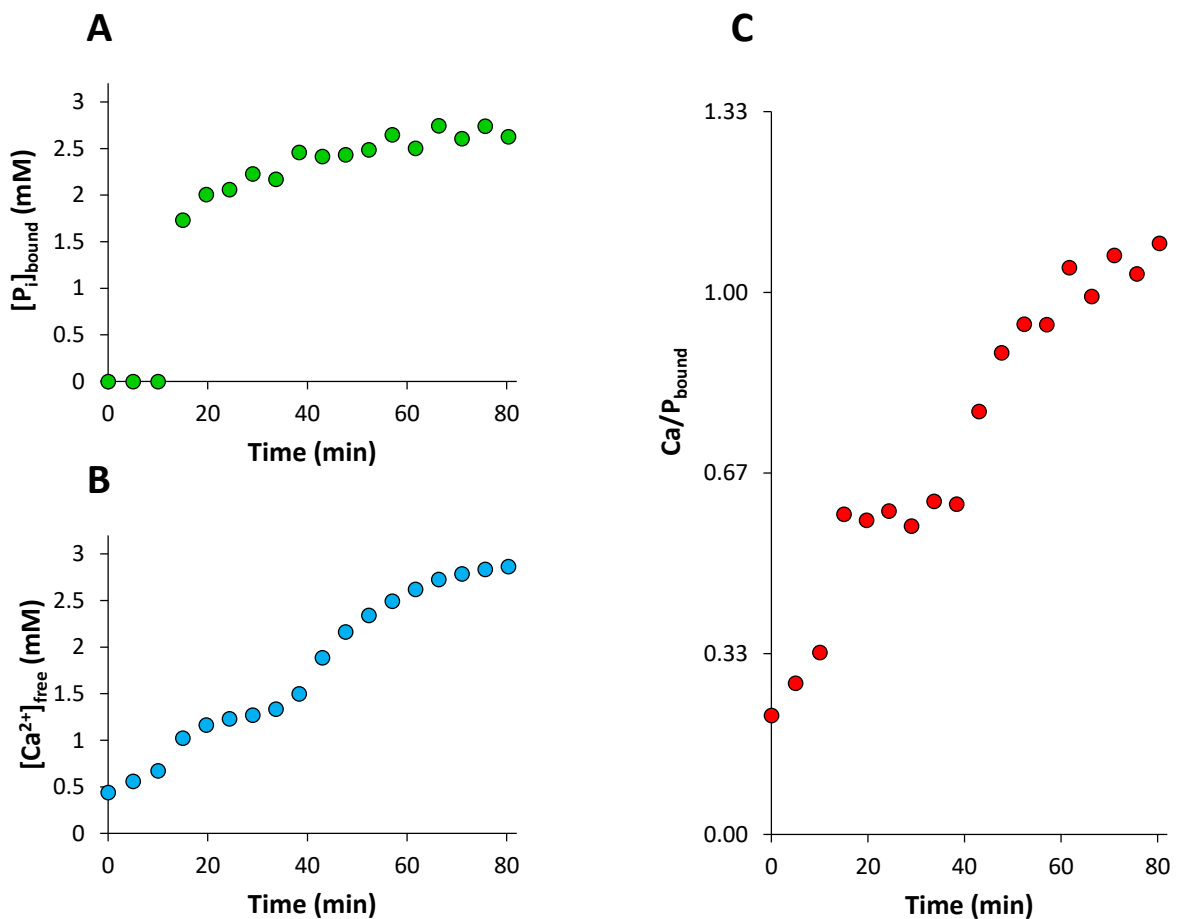


Figure SI 8: Real-time (A) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bound}}$, (B) $[\text{P}_i]_{\text{solid}}$ and (C) $\text{Ca}/\text{P}_{\text{bound}}$ determination for the following mineralization condition: $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 0.67$, $\text{CaxP}_{\text{ini}} = 22 \text{ mM}^2$ (pH 7.4, IS = 150 mM).

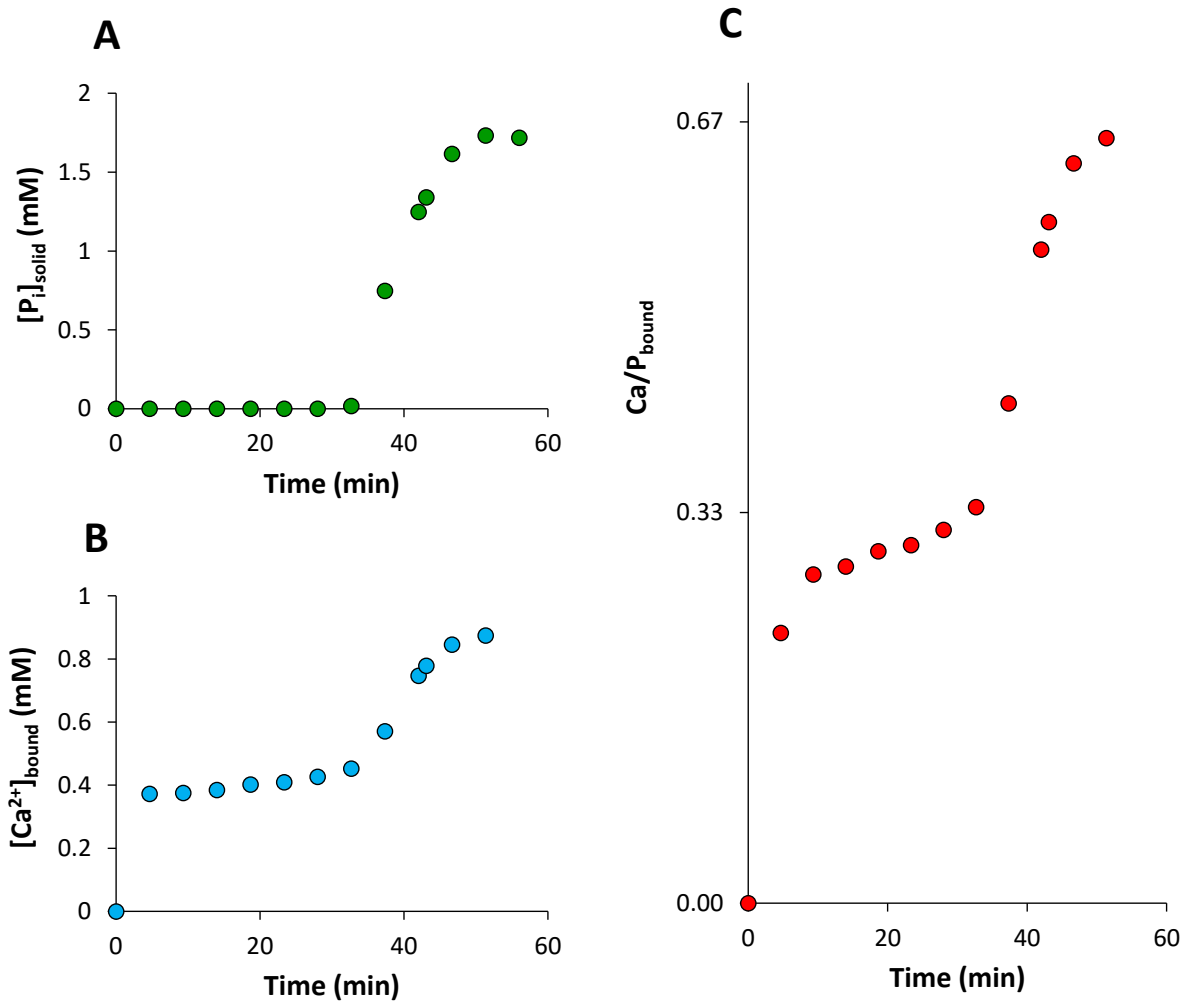


Figure SI 9: Real-time (A) $[Ca^{2+}]_{\text{bound}}$, (B) $[P_i]_{\text{solid}}$ and (C) Ca/P_{bound} determination for the following mineralization condition: $Ca/P_{\text{ini}} = 2,67$, $CaxP_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$ (pH 7.4, IS = 150 mM).

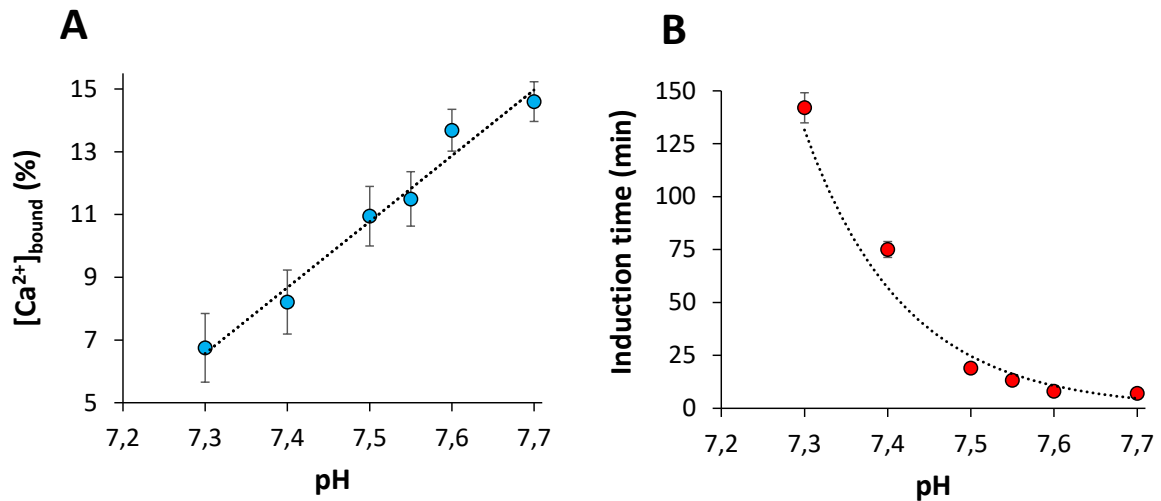


Figure SI 10 : (A) Bound Ca^{2+} relative proportions and (B) PNC lifetime according to different initial pH values for the following mineralization condition: $Ca/P_{ini} = 1,67$, $Ca \times P_{ini} = 18 \text{ mM}^2$ (IS = 150 mM).

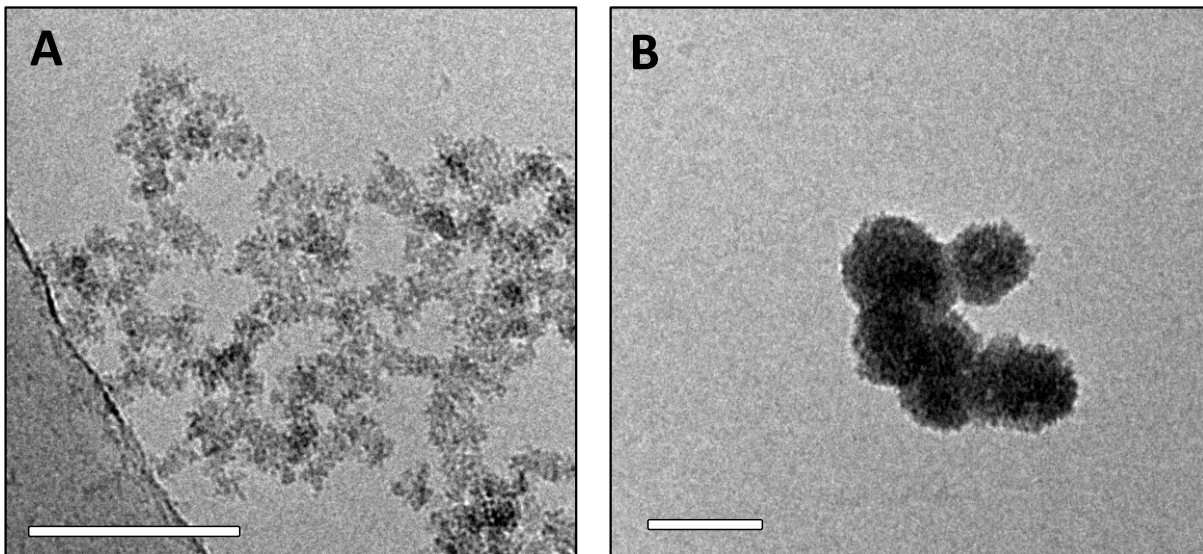


Figure SI 11 : Cryo-TEM observations of a calcium phosphate solution (A) before (3 minutes of induction time) and (B) after (20 minutes after mixing) nucleation was observed onto potentiometry experiments for the following mineralization condition: $Ca/P_{ini} = 1,67$, $Ca \times P_{ini} = 18 \text{ mM}^2$, pH 7.55 and IS = 150 mM.

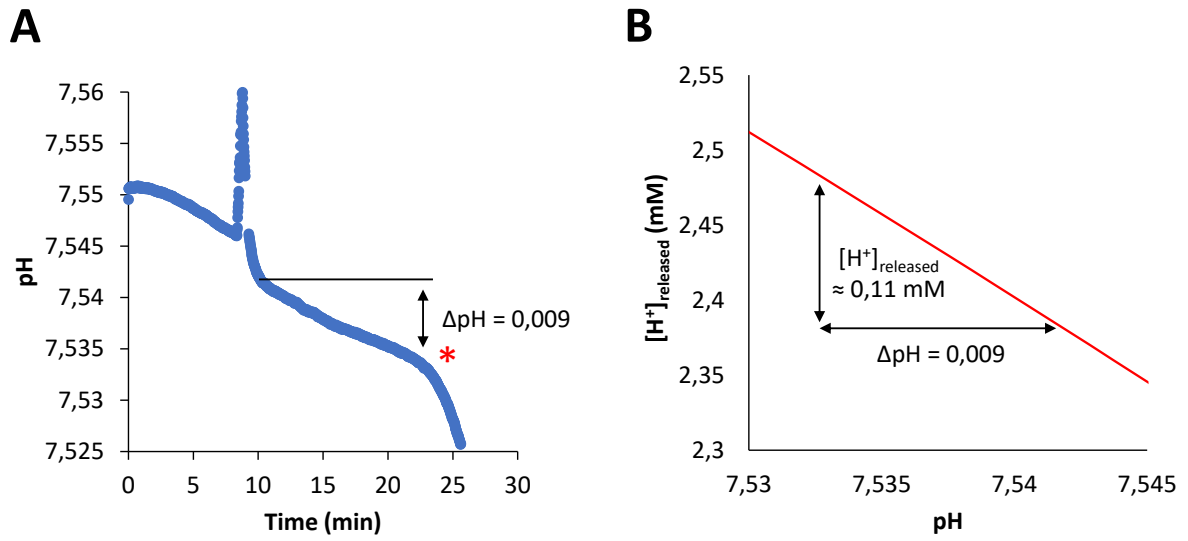


Figure SI 12: Example of (A) pH variation during prenucleation stage ΔpH and (B) corresponding $[\text{H}^+]_{\text{released}}$ using our polynomial model (Fig 9A) for the mineralization condition $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 1,67$, $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$ ($\text{IS} = 150 \text{ mM}$) at pH 7.55.

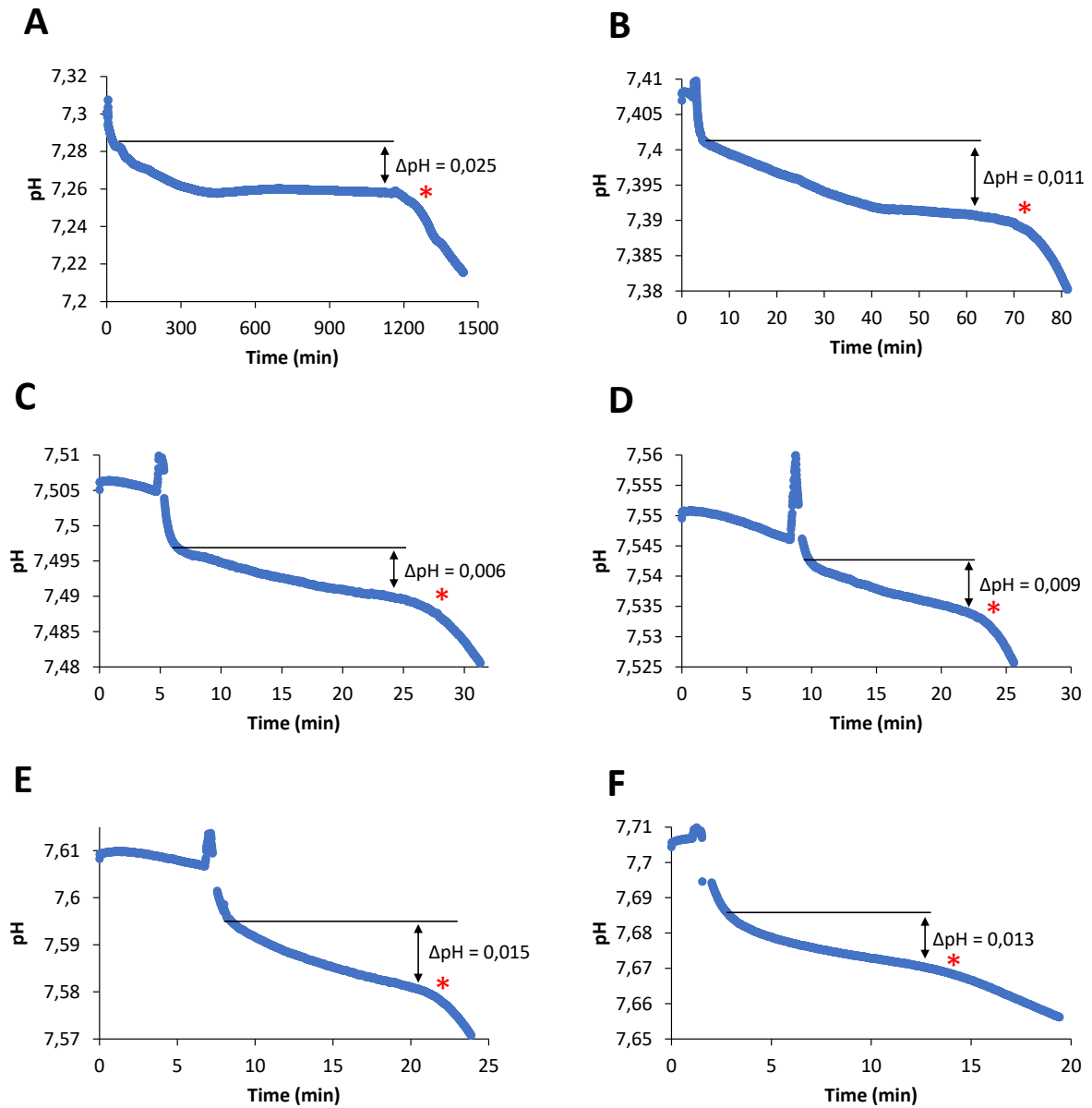


Figure SI 13 : Determination of pH variation during prenucleation stage for the mineralization condition $\text{Ca}/\text{P}_{\text{ini}} = 1,67$, $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}} = 18 \text{ mM}^2$ ($\text{IS} = 150 \text{ mM}$) at various pH : (A) 7.3, (B) 7.4, (C) 7.5, (D) 7.55, (E) 7.6 and (F) 7.7. Red stars indicate nucleation.

III. Conclusion de l'article

Le mécanisme de formation de l'HAP en 4 étapes décrit par Habraken *et al.*¹⁰ a été retrouvé pour chacune de nos conditions. La phase finale caractérisée par RMN ³¹P à l'état solide et par DRX s'est révélée être systématiquement de l'hydroxyapatite « biomimétique », c'est-à-dire nanométrique et plaquettaire composée d'un cœur cristallin et d'une couche de surface amorphe.

Les paramètres expérimentaux de la précipitation (*i.e.* les concentrations absolues (Ca×P) et relatives (Ca/P) en ions phosphates et calcium, le pH et la force ionique) influencent à la fois la quantité et le temps de vie des espèces de prénucléation. Typiquement, dans nos conditions, la cinétique de nucléation pouvait varier de quelques dizaines de secondes à une dizaine d'heure, alors que la proportion d'ions calcium lié dans les PNC variait de 3,5 à 15,7%. Un résumé de nos résultats est représenté dans le *Tableau 1*.

Paramètre	[Ca ²⁺] _{lié,PNC} (%)	Temps de vie des PNC
↗ Ca×P _{ini}	↗	↘
↗ Ca/P _{ini}	↘	↘
↗ pH	↗	↘
↗ Force ionique [KCl]	↘	↗

Tableau 1. Influence de l'augmentation des paramètres expérimentaux sur les proportions d'ions Ca²⁺ dans les PNC et sur le temps de vie des PNC.

Du point de vue de la prénucléation, les résultats ont permis de décrire la formation des PNC comme étant résultante de collisions ioniques entre les ions calcium et phosphates. Plus la quantité d'ions (concentrations absolues) est initialement élevée, plus la quantité PNC est grande ; les concentrations relatives ayant un effet moins marqué. Cet effet est exacerbé lorsque le pH augmente et lorsque la force ionique diminue. Cela s'expliquerait notamment par l'état de protonation relatif des ions phosphates libres en solution par rapport celui des phosphates liés sous formes de PNC. Quant à la force ionique, les clusters de prénucléation ont moins tendance à se former lorsque cette dernière est élevée. La conclusion tirée ne permet pas d'affirmer si les ions spectateurs ont un rôle d'écrantage empêchant les collisions ioniques, ou bien s'ils ne sont pas si spectateurs que cela, en prenant part à la formation d'espèces de prénucléation tout en bloquant les échanges protoniques ayant lieu dans les phosphates liés.

Une relation directe entre la quantité d'espèces de prénucléation et leur stabilité (soit leur temps de vie après précipitation) a pu être déterminée : Le temps de vie des PNC diminue exponentiellement avec la quantité de PNC qui augmente. Les PNC semblent donc s'agréger eux aussi par collisions avec la formation de liaisons H, très probablement.

D'autre part, cette étude permet de déterminer des caractéristiques structurales, dynamiques et mécanistiques quant aux espèces de prénucléation. Par exemple, nos résultats par RMN ³¹P en solution *in situ* semblent montrer que les PNC sont des ions calcium triphosphates [Ca(HPO₄)₂(H₂PO₄)]³⁻, comme proposé par Habraken *et al.*¹⁰. Cette composition semble être particulièrement stable car elle est retrouvée quel que soit le rapport Ca/P_{ini} dans nos conditions.

Par ailleurs, nous avons remarqué que les paramètres expérimentaux pouvaient induire la précipitation de clusters solides en coexistence avec les PNC, si favorables à former directement ces derniers. Typiquement, si trop élevés (pour les concentrations ou le pH) ou trop faibles (pour la force ionique), les collisions ioniques pourraient être favorables à lier les ions calcium et phosphates HPO_4^{2-} avec un rapport 2/3. Ce phénomène de précipitation apparente (ou nucléation secondaire) précéderait la nucléation effective consistant en la transformation de l'intégralité des PNC en la première phase solide repérée par potentiométrie du calcium. Combinant ces observations avec des expériences *in situ* de RMN en solution du noyau ^{31}P pendant la précipitation, nous proposons que la quantité d'ions phosphates dans les PNC est la même que dans les premiers objets formés après la nucléation. Cette hypothèse sera largement exploitée dans le cadre de ce manuscrit et approfondie dans les chapitres 5 et 6 de ce manuscrit.

D'autre part, cette étude permet de contrôler la quantité et la stabilité des espèces de prénucléation en contrôlant simplement les paramètres initiaux. Afin de progresser dans la caractérisation structurale des différentes espèces transitoires par des techniques résolues temporellement (MAS-DNP sur solutions vitrifiées, RMN en solution et RMN du solide *in situ*, cryo-TEM, potentiométrie du calcium...), nous avons choisi des conditions appropriées en termes de quantité de clusters et de stabilité. En effet, la cinétique de nucléation doit être assez lente de manière à avoir une fenêtre temporelle d'analyse raisonnable. De plus, nous souhaitons aussi maximiser la proportion des PNC pour des raisons de sensibilité. Néanmoins, comme nous avons pu le constater dans ce chapitre, le temps de nucléation est inversement proportionnel à la quantité de PNC. Ainsi, il a fallu faire un compromis entre quantité et temps de vie des PNC. Cette étude représente ainsi le fondement de ce travail doctoral, car l'ensemble des conditions qui seront étudiées en découlent.

Nous avons donc sélectionné une condition de précipitation (Chapitres V et VI) induisant la nucléation en moins de 30 minutes consistant en :

- De faibles concentrations en ions calcium et phosphates (4,31 et 2,78 mM soit un produit $\text{Ca} \times \text{P}_{\text{ini}} \approx 12 \text{ mM}^2$).
- Un rapport Ca/P_{ini} de 1,55 de manière à maximiser les proportions des ions calcium et phosphates sous formes de PNC.
- Un pH de 7,75 pour augmenter la quantité de PNC et réduire leur temps de vie.
- Une force ionique de 150 mM.

D'autre part, lors de l'étude de l'influence de l'acide polyaspartique (Chapitre VII), qui a un effet inhibiteur sur la cinétique de précipitation, nous avons sélectionné deux conditions de précipitation plus rapide (~1 et 15 min) de manière à contrebalancer cet effet inhibiteur.

Références bibliographiques

- (1) Mohd Pu'ad, N. A. S.; Abdul Haq, R. H.; Mohd Noh, H.; Abdullah, H. Z.; Idris, M. I.; Lee, T. C. Synthesis Method of Hydroxyapatite: A Review. *Mater. Today Proc.* 2020, 29, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.536>.
- (2) Boskey, A. L.; Posner, A. S. Conversion of Amorphous Calcium Phosphate to Microcrystalline Hydroxyapatite. A PH-Dependent, Solution-Mediated, Solid-Solid Conversion. *J. Phys. Chem.* 1973, 77 (19), 2313–2317. <https://doi.org/10.1021/j100638a011>.
- (3) Posner, A. S.; Betts, F. Synthetic Amorphous Calcium Phosphate and Its Relation to Bone Mineral Structure. *Acc. Chem. Res.* 1975, 8 (8), 273–281. <https://doi.org/10.1021/ar50092a003>.
- (4) Oyane, A.; Kim, H.-M.; Furuya, T.; Kokubo, T.; Miyazaki, T.; Nakamura, T. Preparation and Assessment of Revised Simulated Body Fluids. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003, 65A (2), 188–195. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10482>.
- (5) Termine, J. D.; Posner, A. S. Calcium Phosphate Formation in Vitro: I. Factors Affecting Initial Phase Separation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, 140 (2), 307–317. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90071-8).
- (6) Termine, J. D.; Peckauskas, R. A.; Posner, A. S. Calcium Phosphate Formation in Vitro: II. Effects of Environment on Amorphous-Crystalline Transformation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, 140 (2), 318–325. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90072-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90072-X).
- (7) Christoffersen, J.; Christoffersen, M. R.; Kibalczyk, W.; Andersen, F. A. A Contribution to the Understanding of the Formation of Calcium Phosphates. *J. Cryst. Growth* 1989, 94 (3), 767–777. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(89\)90102-4](https://doi.org/10.1016/0022-0248(89)90102-4).
- (8) Ramírez-Rodríguez, G. B.; Delgado-López, J. M.; Gómez-Morales, J. Evolution of Calcium Phosphate Precipitation in Hanging Drop Vapor Diffusion by in Situ Raman Microspectroscopy. *CrystEngComm* 2013, 15 (12), 2206–2212. <https://doi.org/10.1039/C2CE26556G>.
- (9) Robin, M.; Euw, S. V.; Renaudin, G.; Gomes, S.; Krafft, J.-M.; Nassif, N.; Azaïs, T.; Costentin, G. Insights into OCP Identification and Quantification in the Context of Apatite Biomineralization. *CrystEngComm* 2020, 22 (16), 2728–2742. <https://doi.org/10.1039/C9CE01972C>.
- (10) Habraken, W. J. E. M.; Tao, J.; Brylka, L. J.; Friedrich, H.; Bertinetti, L.; Schenk, A. S.; Verch, A.; Dmitrovic, V.; Bomans, P. H. H.; Frederik, P. M.; Laven, J.; Schoot, P. van der; Aichmayer, B.; With, G. de; DeYoreo, J. J.; Sommerdijk, N. A. J. M. Ion-Association Complexes Unite Classical and Non-Classical Theories for the Biomimetic Nucleation of Calcium Phosphate. *Nat. Commun.* 2013, 4 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms2490>.
- (11) Dey, A.; Bomans, P. H. H.; Müller, F. A.; Will, J.; Frederik, P. M.; With, G. de; Sommerdijk, N. A. J. M. The Role of Prenucleation Clusters in Surface-Induced Calcium Phosphate Crystallization. *Nat. Mater.* 2010, 9 (12), 1010–1014. <https://doi.org/10.1038/nmat2900>.
- (12) Garcia, N. A.; Malini, R. I.; Freeman, C. L.; Demichelis, R.; Raiteri, P.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Harding, J. H.; Gale, J. D. Simulation of Calcium Phosphate Prenucleation Clusters in Aqueous Solution: Association beyond Ion Pairing. *Cryst. Growth Des.* 2019, 19 (11), 6422–6430. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00889>.

**Chapitre IV – Evolution de la composition ionique
dans le *simulated body fluid* (SBF)**

CHAPITRE IV – LA PRESENCE DE CLUSTERS DE PRENUCLEATION DANS LE SBF	179
I. INTRODUCTION	183
II. ARTICLE 2 : FORMATION AND EVOLUTION OF NANOSCALE CALCIUM PHOSPHATE PRECURSORS UNDER BIOMIMETIC CONDITIONS	185
III. CONCLUSION DE L'ARTICLE	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186

I. Introduction

Le SBF (pour Simulated Body Fluid) est une solution mimant la composition ionique du plasma sanguin. Ce type de solution est qualifié de métastable car elle contient des concentrations en calcium et en phosphate en saturation vis-à-vis de l'hydroxyapatite¹. Pour autant, elle ne précipite pas spontanément car la cinétique de nucléation est trop lente². La préparation d'une telle solution est complexe et nécessite de suivre une procédure particulière car elle contient beaucoup de sels dont les équilibres acido-basiques régissent la sursaturation de différentes phases solides comme la calcite CaCO_3 ³ par exemple. Il est donc commun d'observer la formation de précipités non volontaires lors de la préparation d'une telle solution.

Le *Tableau 1* présente les compositions du plasma sanguin et de plusieurs types de SBF. Ces derniers ont notamment été développés pour favoriser la formation d'une phase au détriment d'une autre, ou de s'approcher le plus possible de la composition ionique du plasma sanguin. Typiquement, r-SBF et i-SBF ont tendance à favoriser la précipitation de CaCO_3 , alors que c-SBF et m-SBF, présentant moins d'ions carbonates, favorisent la formation d'hydroxyapatite plus ou moins biomimétique³.

Ion	Plasma sanguin	c-SBF	r-SBF	i-SBF	m-SBF
Na^+	142	142	142	142	142
K^+	5	5	5	5	5
Mg^{2+}	1,5	1,5	1,5	1	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5	2,5	1,6	2,5
Cl^-	103	147,8	103	103	103
HCO_3^-	27	4,2	27	27	10
HPO_4^{2-}	1	1	1	1	1
SO_4^{2-}	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Tableau 1. Composition du plasma sanguin et de différents types de SBF. Proportions tirées d'après Oyane et al.³.

En effet, bien que ces solutions soient métastables et ne précipitent pas spontanément, elles peuvent conduire à la précipitation sous divers contrôles de l'expérimentateur. La minéralisation peut par exemple être obtenue en introduisant un substrat dans la solution de SBF^{4,5}, en augmentant le pH⁶ ou encore en ajoutant des réactifs inorganiques⁷ ou organiques⁸. Il est aussi possible d'utiliser du « 1.5 SBF », consistant en une solution dont les concentrations du SBF sont multipliées par un facteur 1,5⁶, mais dans ce cas la minéralisation est spontanée.

L'usage le plus courant du SBF concerne le dépôt d'HAP sur des substrats pour des applications de régénération osseuse⁹, d'implantations de biomatériaux¹⁰ ou de corrosion¹¹, car la nucléation et la

cristallisation d'HAP peut prendre place sur divers substrats¹². Ainsi, le SBF permet de tester la bioactivité de matériaux d'implants dédiés à la régénération osseuse, définie comme la capacité du matériau à précipiter sélectivement de l'hydroxyapatite biomimétique à sa surface après immersion dans une solution de SBF². Récemment, en 2010, Dey *et al.* ont observé la nucléation de particules amorphes à partir de clusters solubles nanométriques identifiées comme des clusters de prénucléation dans une solution de SBF. Toutefois, l'étude était menée en présence d'un additif acide, l'acide arachidique pouvant interagir avec les ions pour les localiser, les concentrer et induire la nucléation à leur surface⁸. Si ces clusters ont ensuite été observés par Habraken *et al.*¹³, toutes les études expérimentales de ces clusters allaient jusqu'à la cristallisation d'HAP. Ainsi, aucune étude ne s'est, pour l'instant, intéressée uniquement à l'étape de prénucléation pouvant être de durée « infinie » dans une solution métastable telle que le SBF.

Ce chapitre est dédié à l'étude d'une solution métastable de m-SBF, mimant la composition ionique du plasma sanguin. Les résultats exposés dans ce quatrième chapitre sont présentés sous la forme d'un article scientifique réalisé en collaboration avec l'équipe de Dennis Kurzbach, Professeur associé à l'Institut de Chimie Biologique à l'Université de Vienne, publié dans *Analytical Chemistry* et s'intitulant : « *Formation and Evolution of Nanoscale Calcium Phosphate Precursors under Biomimetic Conditions* ». Dans cette étude, nous étudions la formation et la stabilité des PNC après la préparation d'une solution de m-SBF. Nous suivons cette formation au cours du temps *via* diverses techniques résolues temporellement comme la RMN du ³¹P en solution, la potentiométrie du calcium et le cryo-TEM .

L'usage d'une cryosonde pour les expériences *in situ* de RMN du ³¹P en solution a conduit à une résolution temporelle élevée, de l'ordre de 7,5 min/spectre, ce qui nous a permis de suivre la formation et la dynamique des PNC au cours du temps (~24h) sur la base de leur déplacement chimique ³¹P. Des expériences diffusionnelles de type DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) ont par ailleurs permis de déterminer leur taille en solution. Parallèlement, la potentiométrie du calcium a été utilisée pour suivre la concentration en Ca²⁺ lié dans les PNC au cours du temps et de déterminer le rapport Ca/P de ces derniers. Par ailleurs, des observations par cryo-TEM à différentes étapes, nous ont permis de déterminer leur distribution en taille, mais aussi de visualiser leur formation et leur agrégation au cours du temps. Des analyses élémentaires par XEDS (X-ray Energy-Dispersive Spectra) en cryo-TEM nous ont permis de déterminer la distribution des ions phosphate dans et en dehors des PNC.

II. Article 2 : Formation and Evolution of Nanoscale Calcium Phosphate Precursors under Biomimetic Conditions

L'article « *Formation and Evolution of Nanoscale Calcium Phosphate Precursors under Biomimetic Conditions* » est joint dans la section Annexes de ce manuscrit, tel qu'il a été publié dans le journal *Analytical Chemistry*.

III. Conclusion de l'article

Au travers de cette étude, nous démontrons la présence et la stabilité des PNC dans une solution de m-SBF métastable. En particulier, nous montrons qu'une telle solution ne peut pas être considérée comme étant réellement « métastable » avant une période d'environ 20 heures après préparation, car la formation progressive des PNC prend place pendant cette durée. Après cette période, nous n'observons pas d'évolution du système ce qui renseigne sur la stabilité des PNC dans cette solution.

En effet, les résultats de RMN du ^{31}P en solution du noyau ^{31}P , de potentiométrie du calcium, de suivi du pH et nos observations par cryo-TEM s'accordent sur le fait que des PNC se forment progressivement pendant une vingtaine d'heure suivant la préparation d'une solution fraîche. Par ailleurs, nos expériences de RMN en solution du noyau ^{31}P et d'XEDS suggèrent que la majorité, sinon la totalité, des phosphates finissent liés sous formes de PNC dans le m-SBF après cette période. Parallèlement, la potentiométrie du calcium nous a permis d'estimer le rapport Ca/P des PNC à 1/3, en accord avec les résultats exposés dans le chapitre III dont les conditions sont similaires en termes de pH, de force ionique et de température. Ce rapport semble ainsi particulièrement favorable et peut donc être généralisé aux solutions métastables telles que le SBF.

La RMN diffusionnelle de type DOSY, a permis d'estimer le diamètre hydrodynamique des PNC à 2 nm sur la base de leur coefficient de diffusion ($24.10 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$). Cette taille est en bon accord avec nos observations par cryo-TEM qui montrent que la taille des PNC reste constante au cours du temps ($\sim 2\text{--}2,5 \text{ nm}$). Ainsi, seul le nombre de PNC semble augmenter au cours du temps sans influencer leur taille. De plus, ces observations nous permettent d'apprécier l'agrégation des PNC sous la forme de réseaux ramifiés pouvant atteindre jusqu'à 200 nm en taille après 24 heures.

La formation de ces réseaux peut notamment être décrite par des différences de dynamique repérées par des variations du régime d'échange dans l'expérience *in situ* de RMN en solution du noyau ^{31}P . La formation des PNC semble être décrite par un régime d'échange lent dont la vitesse d'échange entre les ions phosphates libres et liés serait inférieure à 10 Hz. A mesure que les PNC se forment et s'agrègent, nous observons un régime d'échange rapide suggérant que plus la surface de PNC est grande et plus l'échange chimique serait rapide.

Cette étude permet ainsi de rationaliser les effets du SBF. Par exemple, la minéralisation de substrat s'apparentant à de la nucléation hétérogène classique peut désormais être expliquée par le modèle non-classique des PNC, dans lequel les PNC, déjà présents dans la solution, peuvent interagir avec des surfaces extérieures ou des additifs organiques, comme proposé par Dey *et al.*⁸.

Références bibliographiques

- (1) Lu, X.; Leng, Y. Theoretical Analysis of Calcium Phosphate Precipitation in Simulated Body Fluid. *Biomaterials* 2005, 26 (10), 1097–1108. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.05.034>.
- (2) Bohner, M.; Lemaitre, J. Can Bioactivity Be Tested in Vitro with SBF Solution? *Biomaterials* 2009, 30 (12), 2175–2179. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.008>.
- (3) Oyane, A.; Onuma, K.; Ito, A.; Kim, H.-M.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Formation and Growth of Clusters in Conventional and New Kinds of Simulated Body Fluids. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003, 64A (2), 339–348. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10426>.
- (4) Ohtsuki, C.; Kamitakahara, M.; Miyazaki, T. Coating Bone-like Apatite onto Organic Substrates Using Solutions Mimicking Body Fluid. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007, 1 (1), 33–38. <https://doi.org/10.1002/term.3>.
- (5) Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* 2006, 27, 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- (6) Hashizume, M.; Nagasawa, Y.; Suzuki, T.; Kawashima, S.; Kamitakahara, M. Effect of Preparative Conditions on Crystallinity of Apatite Particles Obtained from Simulated Body Fluids. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2011, 84 (2), 545–549. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.014>.
- (7) Cüneyt Tas, A. Synthesis of Biomimetic Ca-Hydroxyapatite Powders at 37°C in Synthetic Body Fluids. *Biomaterials* 2000, 21 (14), 1429–1438. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00019-3).
- (8) Dey, A.; Bomans, P. H. H.; Müller, F. A.; Will, J.; Frederik, P. M.; With, G. de; Sommerdijk, N. A. J. M. The Role of Prenucleation Clusters in Surface-Induced Calcium Phosphate Crystallization. *Nat. Mater.* 2010, 9 (12), 1010–1014. <https://doi.org/10.1038/nmat2900>.
- (9) Takemoto, M.; Fujibayashi, S.; Neo, M.; Suzuki, J.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Mechanical Properties and Osteoconductivity of Porous Bioactive Titanium. *Biomaterials* 2005, 26 (30), 6014–6023. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.019>.
- (10) Kim, H.-M.; Miyaji, F.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Preparation of Bioactive Ti and Its Alloys via Simple Chemical Surface Treatment. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996, 32 (3), 409–417. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199611\)32:3<409::AID-JBM14>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199611)32:3<409::AID-JBM14>3.0.CO;2-B).
- (11) Sana, A.; Malik, I.; Mujahid, M.; Akram, M. A.; Adeel Umer, M. Surface Degradation Study of Magnesium Tested in Simulated Body Fluid. *Biomed. Mater. Eng.* 2019, 30 (3), 341–348. <https://doi.org/10.3233/BME-191057>.
- (12) Shin, K.; Acri, T.; Geary, S.; Salem, A. K. Biomimetic Mineralization of Biomaterials Using Simulated Body Fluids for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Eng. Part A* 2017, 23 (19–20), 1169–1180. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0556>.
- (13) Habraken, W. J. E. M.; Tao, J.; Brylka, L. J.; Friedrich, H.; Bertinetti, L.; Schenk, A. S.; Verch, A.; Dmitrovic, V.; Bomans, P. H. H.; Frederik, P. M.; Laven, J.; Schoot, P. van der; Aichmayer, B.; With, G. de; DeYoreo, J. J.; Sommerdijk, N. A. J. M. Ion-Association Complexes Unite Classical and Non-Classical Theories for the Biomimetic Nucleation of Calcium Phosphate. *Nat. Commun.* 2013, 4 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms2490>.

**Chapitre V – Caractérisations structurales des
clusters de prénucléation impliquées dans la
formation de l'hydroxyapatite « biomimétique »**

CHAPITRE V – CARACTERISATIONS STRUCTURALES DES CLUSTERS DE PRENUCLEATION IMPLIQUEES DANS LA FORMATION DE L’HYDROXYAPATITE « BIOMIMETIQUE »	189
I. INTRODUCTION	193
II. MATERIEL ET METHODES	194
1) Conditions de précipitation	194
2) Potentiométrie calcium et pH-métrie	194
3) RMN ³¹ P en solution	195
4) Cryo-TEM	195
5) DNP MAS ³¹ P sur solutions vitrifiées	195
6) DNP MAS ⁴³ Ca sur solutions vitrifiées	196
III. ETUDE STRUCTURALE DE COMPLEXES SOLUBLES DE Ca²⁺ PAR DNP MAS DU ⁴³Ca SUR DES SOLUTIONS VITRIFIEES	196
1) Introduction.....	196
2) Article 3 : ⁴³ Ca MAS DNP NMR of frozen solutions for the investigation of calcium ion complexation.....	197
3) Conclusion de l’article	225
IV. SUIVI TEMPOREL DE LA PRECIPITATION	226
1) Mesures potentiométriques de la précipitation	226
2) Suivi spectroscopique par RMN ³¹ P en solution	228
3) Rapports Ca/P et spéciation des phosphates.....	231
V. CARACTERISATION STRUCTURALE DES PNC PAR DNP MAS	233
1) ⁴³ Ca DNP MAS : applications aux PNC	233
2) ³¹ P DNP MAS.....	236
VI. CONCLUSION	245
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	247

I. Introduction

Les mécanismes non-classiques de la nucléation sont encore très peu compris. Faut de méthodes de caractérisations appropriées, assez peu d'études s'intéressent à la structure des espèces intermédiaires formées.

Il est d'usage de rencontrer des structures amorphes précédant la cristallisation de phosphates de calcium *in vitro*. Premièrement proposé Posner et Betts en 1974, différents phosphates de calcium amorphes (ACP), de rapport molaire Ca/P = 1,2—1,5, ont été préparés en milieu aqueux et analysés par diffraction des rayons X¹. Il s'est avéré que les différents amorphes avaient tous un ordre local et qu'il ne s'agissait pas d'ions simplement disposés de manière aléatoire. C'est de cette étude qu'a émergé la notion de cluster de Posner, défini comme l'entité de base de l'ACP. La comparaison des profils PDF de l'ACP avec l'HAP a permis de détecter des similarités à courtes distances entre les 2 composés. L'année suivante, en 1975, ils ont comparé les fractions cristallines d'os de lapins et, toujours par diffraction des rayons X, ont identifié la signature obtenue comme un mélange d'HAP et d'ACP². Il a ainsi été proposé qu'une phase amorphe soit à l'origine de la nucléation osseuse. Cela a aussi été proposé à partir de l'étude de divers systèmes biologiques tels que la nageoire caudale du poisson-zèbre³, le tibia du rat⁴ ou encore la dentine du rat⁵. Plus récemment, Von Euw *et al.* ont démontré par RMN à l'état solide que le minéral osseux était composé d'un cœur cristallin d'HAP recouverte d'une surface amorphe d'ACP d'environ 0,8 nm de diamètre⁶. Enfin, d'autres phases transitoires ont aussi été proposées *in-vivo*, telles que la brushite⁷ (os d'embryons de poulets) ou le phosphate octocalcique⁸ (crâne de rat).

Si le mécanisme de formation de l'hydroxyapatite en plusieurs étapes a été proposé par Posner et Betts dès 1974, ce n'est qu'en 2010 qu'il est proposé comme étant non classique, à la suite de l'observation des clusters de prénucléation (PNC) par cryo-TEM sur des systèmes modèles *in vitro*⁹. Sur la base des tailles mesurées ($\approx 0,9$ nm), il a été proposé que ces clusters solubles étaient des clusters de Posner. Le modèle a ensuite été affiné en proposant que ces clusters étaient hydratés $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_{30}$ ¹⁰ et que des ions Na^+ pouvaient substituer les ions Ca^{2+} dans la structure¹¹. D'autre part, d'autres formules, basées sur des spectres FTIR et des méthodes *ab initio* ont été proposées telles que $[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2]^{2-}$, $[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3]^{5-}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ¹². Habraken *et al.* ont proposé, sur la base de titrations du calcium et de calculs *ab initio*, que les PNC étaient des triphosphates de calcium¹³ de formule $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)^{3-}$ qui pourrait s'avérer stable d'après des simulations par dynamique moléculaire^{14,15}. Néanmoins, d'autres simulations par dynamique moléculaire proposent aussi des paires ioniques CaHPO_4 comme étant plus stables¹⁶. Ainsi, le peu d'études portant sur la structure de ces espèces prénucléation ne s'accorde pas sur leur nature chimique (composition, structure), faute de méthodes expérimentales permettant de caractériser ces espèces solubles, dynamiques et de tailles nanométriques.

Ce chapitre a pour vocation d'apporter des données expérimentales permettant de mieux définir l'origine des PNC dans le cadre de la nucléation non classique de l'hydroxyapatite. Pour ce faire, nous développons :

a) un modèle *in vitro* dans le cadre de la nucléation non classique de l'hydroxyapatite biomimétique précipitée en milieu aqueux dans des conditions proches du milieu physiologique en termes de concentrations, pH et force ionique.

b) des méthodes et méthodologies de caractérisation par RMN (en solution et à l'état solide) appropriées à la caractérisation structurale de systèmes « hors équilibre ». En particulier et compte tenu de leurs caractères soluble et dynamique, les solutions contenant les PNC ont été vitrifiées à basse température et analysées par RMN DNP MAS de manière à empêcher leur évolution.

II. Matériel et méthodes

1) Conditions de précipitation

Les réactions de minéralisation sont réalisées en mélangeant, à volume égal, une solution contenant des ions calcium avec une solution contenant des ions phosphates tamponnées de force ionique identique (tampon Tris 50 mM et KCl 150 mM) et ajustées aux mêmes pH. L'étude a été réalisée sur deux conditions de précipitation dont les paramètres sont consignés dans le *Tableau 1*. Elles ont été choisies pour deux raisons : (i) leur temps de précipitation assez rapide de manière à observer l'ensemble des phases transitoires relativement rapidement ; (ii) la quantité relativement élevée de PNC en solution pour maximiser la sensibilité. En particulier, la condition 1 conduit à une quantité importante d'ions Ca^{2+} dans les PNC ($\approx 12\text{--}15\%$). La condition Habraken est dérivée de l'étude d'Habraken *et al.*¹³ et a été utilisée dans les expériences de ^{31}P DNP MAS.

Condition	[Ca ²⁺] (mM)	[P _i] (mM)	Ca/P	CaxP (mM ²)	pH	[Tris] (mM)	[KCl] (mM)
1	4,31	2,78	1,55	12	7,75	50	150
Habraken	5,88	4,12	1,43	24	7,4	50	150

Tableau 1. Paramètres initiaux des conditions de minéralisation utilisées dans ce chapitre.

2) Potentiométrie calcium et pH-métrie

Les suivis de la concentration en calcium et du pH ont respectivement été réalisés à l'aide d'une électrode sélective des ions calcium et d'une électrode de pH. Les expériences de potentiométrie ont été enregistrées grâce à un Titrand piloté par le logiciel Tiamo 2.5 commercialisé par Metrohm. Avant chaque expérience, l'électrode de pH a été calibrée en utilisant des solutions tampons à pH 4,01, 7,00 et 9,21. L'électrode de calcium a été calibrée avec 3 solutions de concentration 1, 5 et 15 mM tamponnées (Tris 50 mM) à pH 7,75/7.4 et contenaient 150 mM de KCl pour fixer la force ionique. La détection de la concentration en calcium étant fortement dépendante de la température, de la force ionique et du pH, les solutions de calibration ont été choisies de manière à être les plus proches de nos conditions expérimentales. Avant et entre chaque expérience, les électrodes étaient rincées avec HCl 0,1 M et de l'eau distillée, avant d'être calibrées de nouveau. Pour chaque expérience, la mesure a été effectuée en deux temps :

- Tout d'abord, les électrodes sont placées dans la solution de calcium et l'acquisition du potentiel et du pH est lancée (une mesure/seconde pendant plusieurs heures).

- Une fois la concentration en calcium et le pH stabilisés (typiquement après quelques minutes), la solution de phosphate est ajoutée à la solution de calcium sous agitation magnétique constante pendant toute la durée de la mesure.

3) RMN ³¹P en solution

Toutes les expériences de RMN en solution ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Bruker NEO 500 MHz (fréquence de Larmor du proton) équipé avec une cryosonde Bruker Prodigy BBO de 5 mm de diamètre. La RMN en solution a été utilisée pour étudier la diminution de la quantité de phosphates en solution tout au long de la précipitation par l'étude quantitative *in-situ* du noyau ³¹P.

Typiquement, l'acquisition d'un spectre consistait à envoyer une impulsion à 90° ($t_{90^\circ} = 12 \mu\text{s}$) toutes les 8 secondes pendant 5 minutes. L'expérience était répétée pendant 10 heures donnant un total de 120 spectres. L'analyse quantitative des expériences a été réalisée par l'intégration des signaux. Pour gagner en précision, un capillaire contenant une quantité connue de NaH₂PO₄ dans du D₂O était inséré dans les tubes RMN contenant la solution minéralisante.

4) Cryo-TEM

Des observations par Cryo-TEM ont été réalisées à l'aide d'une caméra ultrascan 1000, 2k x 2k CCD (Gatan, USA) sur un cryomicroscope LaB6 JEOL JEM2100 opérant à 200 kV avec une faible dose d'électrons de manière à protéger la couche de glace vitreuse de toute irradiation avant et pendant la prise de l'image. Pour la préparation des grilles, une goutte (environ 3 μ L) de la solution en cours de minéralisation a été déposée sur une grille Quantifoil (Quantifoil Micro Tools GmbH, Allemagne) à membrane en carbone. L'excès de solution sur la grille était absorbé avec du papier filtre et la grille était rapidement plongée dans de l'éthane liquide de manière à former une couche mince de glace vitreuse. Les échantillons étaient transférés dans le microscope et observés à température cryogénique (-180°C).

5) DNP MAS ³¹P sur solutions vitrifiées

Les solutions contenant les PNC ont été caractérisées à l'aide d'un spectromètre Bruker opérant à 800 MHz (fréquence de Larmor ¹H) couplé à un gyrotron (527 GHz) avec une sonde LTMAS double canaux. Les solutions étaient préparées dans un mélange composé à 20% de glycérol-d8, de 30% de D₂O et de 50% de H₂O. Le radical utilisé était AMUPol (15 mM). Typiquement, quelques minutes (~ 3—5 min) après mélange, la solution en cours de minéralisation était transférée dans un rotor en saphir ($\varnothing = 3,2 \text{ mm}$) qui était ensuite introduit dans la sonde refroidie à 100K de manière à vitrifier la solution. Le rotor était ensuite mis en rotation à une fréquence de 5 kHz. Les déplacements chimiques ¹H et ³¹P ont été fixés à 0 et 2,8 ppm à l'aide d'hydroxyapatite synthétique.

Les expériences par polarisation croisée (CP MAS) ont été réalisées avec des champs RF effectifs de 49 et 59 kHz sur les voies ¹H et ³¹P, respectivement. Le découplage proton était fixé à 115 kHz. Le gain en intensité conférés par la DNP a été déterminé en calculant le rapport des intensités des

signaux avec et sans micro-ondes. Ils ont été estimés entre 20 et 30 de manière générale. Le délai entre les impulsions était optimal à 7,5 s et le temps de contact était optimal à 1 ms.

6) DNP MAS ^{43}Ca sur solutions vitrifiées

Les solutions contenant les PNC ont aussi été caractérisées à l'aide d'un spectromètre Bruker opérant à 400 MHz (fréquence de Larmor ^1H) couplé à un gyrotron (263 GHz). Les solutions étaient préparées dans un mélange composé à 20% de glycérol-d8, de 30% de D_2O et de 50% de H_2O . Le radical utilisé était AMUPol (mM). Après quelques minutes de mélange (~ 3—5 min), la solution en cours de minéralisation était transférée dans un rotor en saphir ($\varnothing = 3,2$ mm) qui était ensuite introduit dans la sonde refroidie à 100K de manière à vitrifier la solution. Le rotor était ensuite mis en rotation à une fréquence de 8 kHz. Le déplacement chimique ^{43}Ca a été fixée à 0 ppm en utilisant une solution de CaCl_2 saturée à température ambiante, alors que le déplacement chimique ^1H a été fixée à l'aide d'une hydroxyapatite de synthèse.

Les expériences CP MAS ont été réalisées avec des champs RF effectifs de 56 et 32 kHz sur les voies ^1H et ^{43}Ca , respectivement. Le découplage proton était fixé à 67 kHz. Les gains en intensité conférés par la DNP ont été calculés comme les rapports des intensités des signaux avec et sans micro-ondes et ont été estimés entre 70 et 110 sur la voie proton. Le délai entre les impulsions était optimal à 4 s et le temps de contact utilisé était de 3 ms.

III. Etude structurale de complexes solubles de Ca^{2+} par DNP MAS du ^{43}Ca sur des solutions vitrifiées

1) Introduction

Si le noyau ^{31}P est un spin $\frac{1}{2}$ ne souffrant pas particulièrement de problèmes de sensibilité, il n'en va pas de même pour le noyau ^{43}Ca . Ce dernier possède un rapport gyromagnétique faible (6,7% de celui du ^1H), une faible abondance naturelle de 0,135% et est un noyau quadripolaire ($I = 7/2$). Ces caractéristiques intrinsèques lui confèrent une faible sensibilité qui rend son étude systématique problématique. Dans cette première partie de chapitre, nous développons une méthodologie permettant d'étudier des solutions vitrifiées de calcium enrichies en ^{43}Ca par DNP MAS.

En raison de sa faible sensibilité intrinsèque, peu d'études se sont intéressées à la RMN à l'état solide du ^{43}Ca ¹⁷. Il faut généralement faire usage de méthodes permettant d'augmenter la sensibilité de ce noyau, telles que l'utilisation de très haut magnétiques statiques, l'enrichissement isotopique ou la DNP. Une étude menée par Daniel Lee *et al.* s'est en particulier intéressée à l'étude du noyau ^{43}Ca de l'hydroxyapatite en abondance naturelle en utilisant la DNP MAS. Les gains en sensibilité résultants ont notamment permis l'acquisition de spectres 1D ^{43}Ca CP MAS en moins d'une heure, ainsi qu'une expérience bidimensionnelle de type Hetcor ^1H — ^{43}Ca en une journée¹⁸. Notons toutefois qu'un rotor de 3,2 mm de diamètre contient environ 20 mg de poudre, soit environ 10 μg de ^{43}Ca dans le cas de l'hydroxyapatite en abondance naturelle. Un calcul rapide de la masse de ^{43}Ca présent dans la condition de minéralisation 1 pour 15 μL (volume effectif d'analyse dans un rotor de 3,2 mm) donne

environ 3 ng de ^{43}Ca en abondance naturelle, soit 3300 fois moins que leur étude. Autant dire qu'il est impossible d'étudier des solutions de calcium vitrifiées sans enrichir la solution en ^{43}Ca , même avec les gains en sensibilité conférés par la DNP MAS. Enrichir au maximum en ^{43}Ca (environ 62,2%) permettrait néanmoins de monter à 1,4 μg de ^{43}Ca dans le rotor, ce qui rendrait l'utilisation de la DNP MAS en ^{43}Ca possible, bien que coûteuse financièrement.

Le deuxième problème lié au ^{43}Ca est son caractère quadripolaire qui élargit les signaux obtenus d'une part, mais aussi complique l'expérience de CP, centrale à l'utilisation de la DNP MAS, à cause de difficultés à maintenir l'étape du spin-lock¹⁹. La séquence de CP reste néanmoins possible en se limitant à des puissances très faibles, mais le gain de sensibilité usuellement observé pour les spins $\frac{1}{2}$ n'est pas observé pour les spins quadripolaires, bien au contraire. Cette séquence reste néanmoins intéressante pour réaliser de l'édition spectrale, notamment dans le but de sonder les proximités spatiales entre les ions calcium et les espèces protonées voisines.

Ainsi, nous avons dû procéder à un développement méthodologique pour étudier par RMN DNP MAS du ^{43}Ca des solutions vitrifiées dans les meilleures conditions possibles. Dans les paragraphes suivants, nous décrivons cette méthodologie permettant l'étude de solutions vitrifiées modèles de complexes de Ca^{2+} par RMN DNP MAS du ^{43}Ca (^{43}Ca CP MAS et ^1H - ^{43}Ca HetCor). Les molécules complexantes choisies sont l'eau, l'EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) et l'acide L-aspartique (LAsp). Les résultats sont présentés sous la forme d'un article soumis à *Analytical Chemistry* et intitulé : « ^{43}Ca MAS DNP NMR of frozen solutions for the investigation of calcium ion complexation ».

2) [Article 3 : \$^{43}\text{Ca}\$ MAS DNP NMR of frozen solutions for the investigation of calcium ion complexation](#)

^{43}Ca MAS DNP NMR of frozen solutions for the investigation of calcium ion complexation

Tristan Georges¹, Romain Chèvre², Christel Gervais¹, Pierre Thureau², Giulia Mollica² and Thierry Azais^{1*}

¹*Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France*

²*Aix Marseille Univ, CNRS, ICR, 13397 Marseille, France*

*Corresponding author: thierry.azais@upmc.fr

Abstract

Calcium ion complexation in aqueous solutions is of paramount importance in biology as it is related to cell signaling, muscle contraction or biomineralization. However, Ca^{2+} —complexes are highly dynamic soluble entities challenging to describe at the molecular level. Nuclear magnetic resonance (NMR) appears as a method of choice. However, ^{43}Ca NMR exhibits severe limitations arising from its low natural abundance coupled to a low gyromagnetic ratio and its quadrupolar nature, which overall make it a very unreceptive nucleus. Here we show that ^{43}Ca DNP MAS NMR of ^{43}Ca -labelled frozen solutions is an efficient approach to obtain structural insights on calcium ions complexed with representative ligands including water molecules, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and L-aspartic acid. In these conditions, we show that ^{43}Ca nuclei belonging to Ca^{2+} complexes exhibit rather low quadrupolar couplings (typically C_Q ranging from 0.6 to 1 MHz) due to high symmetrical environment and residual dynamics in vitrified solutions at 100K. As a consequence, when ^1H - ^{43}Ca cross polarization (CP) is used to observe ^{43}Ca central transition, the use of “high-power” $\nu_{\text{RF}}(^{43}\text{Ca})$ conditions – typically used to detect spin $\frac{1}{2}$ nuclei – provides ~ 120 times larger sensitivity than “low-power” conditions usually employed for quadrupolar nuclei. These conditions allow 2D ^1H - ^{43}Ca HetCor spectra to be readily recorded, highlighting the different Ca^{2+} —ligand interactions in solution. This significant increase in NMR sensitivity is the result of the combination of distinct advantages: (i) a more efficient ^1H -mediated polarization transfer from DNP, resembling the case of low-natural abundance spin $\frac{1}{2}$ nuclei; (ii) a reduced dynamics, allowing the use of CP as a sensitivity enhancement technique; (iii) the presence of a relatively high symmetrical Ca environment, which combined to residual dynamics, leads to the averaging of the quadrupolar interaction and hence to efficient high-power CP conditions. Interestingly, these results indicate that the use of high-power CP conditions is an effective way of selecting symmetrical/dynamic ^{43}Ca environments of calcium-containing frozen solution, capable of filtering out more rigid and/or anisotropic ^{43}Ca sites characterized by larger quadrupolar constants. This approach could open the way to the atomic-level investigation of calcium environments in more complex, heterogeneous frozen solutions, such as those encountered at the early stages of biomineralization.

Introduction

Calcium is the 5th most profuse element in mass in the Earth's Crust^{1,2} and is of crucial importance for many organisms as it is involved in many physiological processes such as cell signaling^{3,4}, muscle contraction⁵, or biomineralization⁶.

In both intracellular and extracellular compartments, spatial and temporal variations of calcium concentrations are controlled by various calcium-binding proteins³. For example, calcium-complexation with calmodulin induces a change in the protein's conformation that triggers several cellular phenomena such as cell differentiation, proliferation or apoptosis⁷. Calcium fluxes and concentration variations are also related to muscle contraction that are controlled by actin and myosin proteins^{8–10}. On the other hand, excess of calcium ions is suspected to be involved in cardiovascular¹¹ or neurodegenerative¹² diseases.

Moreover, calcium is used by many organisms to produce mineralized structures or tissues through the precipitation of various biominerals. For example, calcium carbonate is principally found for invertebrates in the form of aragonite, calcite, vaterite or even amorphous calcium carbonate^{13,14}. On the other hand, calcium phosphate is involved in mammals hard tissues in the form of hydroxyapatite in bones and teeth^{15–17}. The biomineralization process is mediated by various specific proteins controlling the nucleation and the crystallization of the final mineral phase through complex mechanisms that remain obscure at the molecular level. For example, acidic proteins are involved in the formation of calcium carbonates¹⁸, while various calcium-binding phosphoproteins and intrinsically disordered proteins¹⁹ are believed to control hydroxyapatite formation in bones. Recently, it has been reported that calcium carbonates and calcium phosphates precipitation follows non-classical nucleation pathways where stable solute prenucleation species (nanometric clusters or dense liquid phases) exist in solution prior to the precipitation.^{20–23} Inside such prenucleation species, calcium ion binding with phosphates or carbonates leads to highly dynamical entities where bonded ions exchange continuously with their free analogues leading to so-called dynamically ordered liquid-like oxyanion polymer (DOLLOP)²⁴.

Altogether, calcium—protein complexation and ion binding phenomenon are of crucial importance *in-vivo* and crucial to understand for various fields of research including biological chemistry, biomineralization or medicine. However, these calcium-based nanometric soluble entities are highly dynamic and challenging to describe at the molecular level.

Therefore, nuclear magnetic resonance (NMR) appears as a key technique, because of its ability to probe dynamics, structure and interactions at the atomic scale. However, the use of ⁴³Ca NMR is still limited because of severe intrinsic sensitivity drawbacks²⁵. Indeed, ⁴³Ca, the NMR-active stable isotope of calcium, possesses a natural abundance of only 0.135% and a small gyromagnetic ratio ($| \gamma_{43\text{Ca}} | / \gamma_{1\text{H}} \sim 0.07$) making it a highly insensitive nucleus. Moreover, ⁴³Ca is a 7/2 quadrupolar spin, leading to line broadening effects arising from the first and second order quadrupolar couplings²⁶. Last but not least, calcium concentrations in physiological conditions are low, around 2.5 mM in vertebrates blood plasma^{27–29}, and around 10 mM in seawater^{30,31} for example.

Hence, few studies using ⁴³Ca solution NMR are reported on complexed Ca²⁺ with biomolecules. Dynamical information, such as the exchange rate regime, is mainly extracted from such analyses. When the exchange rate regime is favorable, the complexation site can be determined³². For example, Parello *et al.*³³ correlated ⁴³Ca quadrupole relaxation to a change of the parvalbumin protein conformation during Ca²⁺ complexation. ⁴³Ca solution NMR can also inform on the dynamics of the

complex. For example, Andersson *et al.*³⁴ explored the rigidity of the Ca²⁺-bonding sites in Parvalbumin, Troponin C and Calmodulin through rotational correlation times analysis.

In the case of solids, ⁴³Ca solid-state NMR is a method of choice to access Ca²⁺ chemical environment in various class of materials²⁶. In particular, in organic complexes and in metalloproteins, it appears that ⁴³Ca chemical shift is related to both Ca-O distances and Ca coordination number^{35,36}. Moreover, ⁴³Ca solid-state NMR is sensitive to variations on the magnetic shielding and electrical field gradient tensors leading to fine insights into some crystalline structures²⁵. As previously mentioned, applications of ⁴³Ca NMR are rather limited due to the lack of sensitivity at natural abundance, although approaches such as the use of high magnetic field, large rotors, or dedicated signal-enhancing NMR pulse sequences^{37,38} allow to circumvent this issue. The acquisition of 1D ⁴³Ca spectra is possible within few hours to days leading to the characterization of various synthetic^{39–41} and even biological samples^{42,43}. However, getting deeper information from 2D experiments is still impossible at natural abundance. In this case, it is possible to combine the previously mentioned strategies with ⁴³Ca labelling^{44,45} and/or MAS DNP⁴⁶. In the case of ⁴³Ca-labelled samples, ⁴³Ca 2D and triple-resonance NMR experiments have been reported, but the commercially-available ⁴³Ca-labelled starting chemical, *i.e.* ⁴³Ca-labelled calcite (CaCO₃), is expensive and requires chemical synthesis skills to produce the desired ⁴³Ca-labelled material.

In the case of MAS DNP, NMR signal enhancement is achieved by transferring the electronic spin polarization of stable unpaired electrons (usually nitroxide biradicals) to the nuclear spins (typically protons) under microwave irradiation at cryogenic temperatures. Following ¹H-¹H spin-diffusion, ¹H hyperpolarization is then transferred to the nuclei of interest through a cross-polarization (CP) step, potentially leading to NMR signal enhancements of several orders of magnitude^{47–49}. Therefore, the intensity of the NMR signal under “indirect” (*i.e.* ¹H-mediated) DNP depends on the efficiency of spin diffusion among ¹H nuclei, as well as on the efficiency of cross polarization. The latter is typically low in the case of a quadrupolar nucleus such as ⁴³Ca because proper magnetization spin lock, required in CP, can be prevented by the time dependence of the first-order quadrupolar interaction. A viable option to partially circumvent this issue is to use low radio-frequency (RF) fields^{50–53}. In DNP NMR^{46,54–56} applications, RF fields comprised between 0.8 and 20 kHz have been reported on quadrupolar nuclei for proton-quadrupolar nucleus CP MAS. In the case of ⁴³Ca, MAS DNP NMR was successfully used by Lee *et al.*⁴⁶ to understand the chemical environment of hydroxyapatite by recording ¹H-⁴³Ca dipolar-based 2D correlation spectra that enabled the distinction of core and surface Ca²⁺ sites.

Here we propose a novel approach to study Ca-based complexes in solution to understand Ca²⁺ complexation by solute ligands. We show that frozen solutions of Ca-based complexes can be efficiently investigated using ¹H-mediated ⁴³Ca MAS DNP NMR, enabling molecular-level characterization of the interaction sites around the calcium ions. The DNP MAS approach benefits from two advantages: (*i*) the low temperature (100 K) limits the dynamics in solution and allows the use of dipolar-based sequences (such as cross polarization CP) to study ligand-calcium interactions. (*ii*) DNP leads to significant ⁴³Ca signal enhancement that enables to overcome the intrinsic low sensitivity of ⁴³Ca. Different solutions were investigated for which calcium is complexed by water molecules, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or L aspartic acid (L-Asp). The latter ligand was chosen to mimic Ca²⁺ interaction with acidic amino acids commonly found in mineralizing proteins.

More specifically, our data show that the sensitivity of ¹H-mediated ⁴³Ca MAS DNP NMR experiments carried out on frozen solutions strongly depends on the RF conditions used during ¹H-⁴³Ca cross polarization. In particular, “high-power” ⁴³Ca RF conditions (*i.e.* typically employed for spin ½) exhibit higher performances than “low-power” ⁴³Ca RF conditions (*i.e.* typically used for quadrupolar

nuclei). Using high-power conditions, 2D ^1H - ^{43}Ca HetCor experiments are readily recorded (0.5 to 28 hours depending on ^{43}Ca concentration) and allow to distinguish the complexation with different ligands in solution. Importantly, our results suggest that the use of high-power ^1H - ^{43}Ca CP conditions on frozen solutions provide the required sensitivity to *selectively* detect highly symmetrical and/or dynamic ^{43}Ca environments over more rigid and/or anisotropic environments, which are not enhanced under these conditions. This approach could open the way to the selective investigation of more complex, heterogenous calcium-containing solutions as those encountered at early stages of calcium phosphate phases in a biomineralization context.

Methods

- **Sample preparation**

^{43}Ca -Labelled CaCO_3 (62.2 %) was purchased from Cortecnet. All other reagents were purchased from Sigma Aldrich and used as received.

Calcium-ion complexed with water molecules (Ca-H₂O). The Ca-H₂O sample was prepared by dissolving 30.9 mg of ^{43}Ca -Labelled CaCO_3 into 500 μL of HCl aqueous solution (1 M). The solution was degassed with N_2 for 2 hours (in order to produce Ca^{2+} acidic aqueous solution free of carbonates) before adding 300 μL of D_2O and 200 μL of glycerol- d_8 ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}/\text{glycerol-}\text{d}_8$ volume ratio was 5/3/2). Finally, Tris buffer was added (6.1 mg, 50 mM) to rise the pH of the solution up to 7. Final Ca^{2+} concentration was 300 mM. The final H/D molar ratio was around 1/2.

Calcium-ion complexed with ethylenediaminetetraacetic acid (Ca-EDTA). The Ca-EDTA sample was prepared similarly to Ca-H₂O except that ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tetrasodium salt dihydrate ($\text{NaOOCCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COONa})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ was added (3.1 mg, 37.5 mM) and that the final Ca^{2+} concentration was 75 mM. The final pH was adjusted to 12 using aqueous NaOH. The final $\text{Ca}^{2+}/\text{EDTA}$ molar ratio was 2/1.

Calcium-ion complexed with L-aspartic acid (Ca-LAsp-50 or Ca-LAsp-100). The Ca-LAsp samples were prepared as above except that L-Aspartic acid (1.5 mg, 23 mM) was dissolved into a 46 mM or 23 mM Ca^{2+} solution, leading to aspartic acid/ Ca^{2+} percentage ratios of 50 % or 100 %, respectively (Ca-LAsp-50 or Ca-LAsp-100).

For further DNP characterizations, 1.1 mg (15 mM) of Amupol was dissolved into 100 μL of the desired solution. Then aliquots of 15 μL of these solutions were placed in 3.2 mm sapphire NMR rotors with Teflon inserts. Solutions were then introduced into the low temperature DNP probe at 100K.

- **MAS DNP NMR experiments**

All DNP solid-state NMR spectra were acquired on a Bruker 9.4 T wide-bore magnet with an AVANCE-III NMR console and a 3.2 mm DNP low-temperature double-resonance $^1\text{H}/^{43}\text{Ca}$ MAS probe. Larmor frequencies were respectively 400.13 and 26.93 MHz for ^1H and ^{43}Ca . Microwaves were applied using a gyrotron (frequency, 263 GHz; power, 4 W) connected to the NMR probe. ^{43}Ca chemical shift was calibrated at 0 ppm using a saturated CaCl_2 solution at room temperature. ^1H chemical shift was calibrated at 0 ppm using a synthetic hydroxyapatite. All spectra were recorded at a MAS frequency of 8 kHz.

^1H MAS spectra were recorded using Hahn-echo sequence with the echo delay set to one rotor period. The radio frequency (RF) field was 67 kHz for both the 90° and 180° pulses. Enhancement factors ($\epsilon(^1\text{H})$) were determined by comparing ^1H relative intensities with and without microwaves irradiation. ^1H recycle delays were determined using a saturation recovery scheme and were set to $1.3\times T_1$ (typically between 1 and 4 s).

The $^1\text{H} \rightarrow ^{43}\text{Ca}$ CP MAS experiments were optimized according to two distinct Hartmann-Hahn conditions: (i) A low power condition (“quadrupolar condition”, or “LP CP”) were ^1H and ^{43}Ca RF fields were set to 11 kHz and 0.8 kHz, respectively. (ii) A high-power condition (“spin $\frac{1}{2}$ condition”, or “HP CP”) were ^1H and ^{43}Ca RF fields were set to 56 and 32 kHz, respectively. Contact time was found to be optimal at 3 ms for Ca- H_2O and Ca-EDTA samples and at 5 ms for Ca-LAsp. ^{43}Ca CP MAS spectra were proton decoupled during acquisition using spinal-64 scheme (67 kHz).

Two-dimensional $\{^1\text{H}\}^{43}\text{Ca}$ HetCor NMR spectra were obtained using the high-power CP condition and by recording 16 to 2100 scans each and 32-48 t_1 increments. FSLG homonuclear decoupling scheme operating at an effective field of 90 kHz was used for the proton dimension.

1D ^{43}Ca MAS spectra were also recorded using a hyperbolic secant sequence with a sechinv pulse (6.9 kHz, 1000 μs) followed by a 90° selective observation pulse with a recycle delay of 15 s.

- **Numerical simulations and calculation of NMR parameters**

Starting from a $13 \text{ \AA} \times 13 \text{ \AA} \times 13 \text{ \AA}$ box in which a calcium cation Ca^{2+} and two chloride anions Cl^- were initially introduced, 70 H_2O molecules were added and both cell parameters and atomic positions were then relaxed with the VASP (Vienna Ab Initio Simulation Package) code⁵⁷ based on the Kohn–Sham Density Functional Theory (DFT) and using a plane-wave pseudopotential approach. The potential energy surfaces were then explored by *ab initio* molecular dynamics at 300 K with time steps set at 1.5 fs. A microcanonical ensemble in the NVT (constant number of molecules, constant volume and constant temperature) approach was used. The local energetical minima found were then optimized at 0 K. Similarly, a calcium cation Ca^{2+} , a molecule of ethylenediaminetetraacetate (EDTA^{4-}), 62 H_2O molecules and 2 H_3O^+ were relaxed in an initial $13 \text{ \AA} \times 13 \text{ \AA} \times 13 \text{ \AA}$ box. Finally, a calcium cation Ca^{2+} , a molecule of L Aspartate (L-Asp⁻), 39 H_2O molecules and one OH^- were relaxed in an initial $13 \text{ \AA} \times 13 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA}$ box.

The ^{43}Ca quadrupolar parameters were then calculated on 0K optimized structures using the QUANTUM-ESPRESSO code⁵⁸ keeping the atomic positions equal to the values previously calculated with VASP. Calculations were performed using the generalized gradient approximation (GGA) with Perdew, Burke, and Ernzerhof (PBE) functionals and norm conserving pseudopotentials⁵⁹ in the Kleinman Bylander form⁶⁰. The wave functions are expanded on a plane wave basis set with a kinetic energy cut-off of 80 Ry. The experimental value of the quadrupole moment of ^{43}Ca ($Q = -40.8 \times 10^{-30} \text{ m}^2$) was used to calculate C_Q ⁶¹.

Results and discussion

Calcium ion complexed with water molecules

Figure 1A displays 1D ^{43}Ca DNP MAS NMR spectra of the Ca- H_2O sample obtained with different conditions: HP CPMAS, LP CPMAS and direct excitation using the hyperbolic secant (HS) sequence. In

the presence of different Ca-atom environments, we should expect a difference among the HP CP, LP CP and HS ^{43}Ca spectra. Notably, while HP CP conditions should only reveal calcium sites in relatively symmetric environments (*i.e.* corresponding to small quadrupolar coupling constants), the LP CP conditions should also reveal sites that are characterized by larger quadrupolar constants, and hence show a correspondingly larger central transition linewidth (see Fig. SI 1 for examples of ^1H - ^{43}Ca CP spectra of hydroxyapatite acquired using LP CP while HP CP did not allow any detection). However, both CP conditions lead to almost identical ^{43}Ca spectra showing a single symmetrical resonance ($\delta(^{43}\text{Ca}) = -10.5$ ppm, full width at half maximum, FWHM = 20.2 ppm) compatible with the presence of Ca^{2+} ions coordinated by water molecules. This similarity between the spectra acquired with the two CP conditions strongly suggests that ^{43}Ca central transition is not significantly broadened by 2nd order quadrupolar interaction.

Interestingly, the HP CPMAS condition is significantly more efficient in terms of sensitivity (SNR = 264 in 4.5 min of acquisition) than the LP CPMAS condition (SNR = 7 in 30 min of acquisition).

The absolute efficiency for each condition can be estimated by calculating the sensitivity per unit time as follows:

$$S = \frac{\text{SNR}}{\sqrt{t_{\text{exp}}}} \quad (2)$$

where SNR is the signal-to-noise ratio of a given experiment and t_{exp} is the corresponding experimental time of acquisition. After normalization, the absolute sensitivity of the two CPMAS conditions can be compared, revealing that the HP CPMAS condition is ~120 times more efficient than the LP CP condition for the frozen Ca-H₂O sample (Figure 1B). This greatest sensitivity shows that, in our conditions, the ^{43}Ca central transition of the Ca-H₂O sample behaves as a spin $\frac{1}{2}$ under high power RF conditions (although $I(^{43}\text{Ca}) = 7/2$). This finding is in line with the absence of 2nd order quadrupolar lineshape for the ^{43}Ca central transition that may be explained by (*i*) the highly symmetric environment of water molecules complexing Ca^{2+} in solution and/or (*ii*) residual dynamics still present at 100K leading to an averaging of anisotropic couplings.

The high sensitivity generated by the HP CP condition did not allow the acquisition of ^{43}Ca CPMAS spectrum in the absence of microwave irradiation (MW OFF) as only noise was recorded. Although the determination of the DNP enhancement (ϵ) for ^{43}Ca as the ratio between the MW ON and the MW OFF spectra could not be accurately calculated, we estimated $\epsilon_{^{43}\text{Ca HP CP}} > 70$ (Figure 1C). Interestingly, this DNP enhancement factor seems close to the one obtained for ^1H DNP NMR spectra ($\epsilon_{^1\text{H}} = 90$; Fig. SI 2) suggesting a homogenous distribution of the polarizing agent within the H₂O/D₂O/glycerol-d₈ (5/3/2) frozen solution.

To achieve efficient direct excitation (*i.e.* not *via* ^1H nuclei) of quadrupolar and insensitive nuclei like ^{43}Ca , dedicated NMR pulse sequences are typically used, which can significantly increase the sensitivity. Using the HS experiment, the direct-excitation signal of a quadrupolar nucleus can be increased by a theoretical factor of $I \times 2$ (*i.e.* 7 in the case of ^{43}Ca) by relying on population transfer from satellite transitions to the central transition³⁸. The corresponding ^{43}Ca HS NMR (MW ON) spectrum is displayed in Figure 1A. In the absence of $\{^1\text{H}\}$ heteronuclear decoupling, the ^{43}Ca HS spectrum showed a single symmetrical resonance ($\delta(^{43}\text{Ca}) = -10.5$ ppm, FWHM = 25.5 ppm). The evaluation of the corresponding absolute efficiency (SNR = 155 in 440 min of acquisition) indicates that the HS experiment is 7 times more efficient than LP CP but 16 times less efficient than HP CP for a Ca-H₂O frozen solution (Figure 1B). Interestingly, the HS experiment provides a significant DNP enhancement factor of $\epsilon_{\text{HS } ^{43}\text{Ca}} = 5.5$ (Fig. SI 3). Such ^{43}Ca enhancement probably arises from direct ^{43}Ca excitation that

might be due to the large EPR linewidth of the AMUPol radical used here, which guarantees efficient polarization transfer over a broad range of nuclear Larmor frequencies.

From the previous data, it is possible to evaluate the theoretical experimental acquisition time for HP CP conditions of Ca-H₂O (⁴³Ca-labelled 62.2%) as a function of the Ca²⁺ concentration (Figure 1D). For physiological concentrations of ⁴³Ca, a 1D spectrum with a SNR = 20 (*i.e.* allowing to record 2D spectra) would be acquired in 46 minutes to 3 days, while a spectrum with a SNR=5 would require between 3 minutes and 4 hours of acquisition time. This simple calculation shows that ⁴³Ca MAS DNP NMR analysis of Ca²⁺-complex solutions in physiological conditions requires high ⁴³Ca labelling such as 62.2%. Moreover, we note here that by analyzing calcium vitrified solutions using CP HP, the amount of ⁴³Ca is reduced by a factor of 120 in comparison with solid samples.

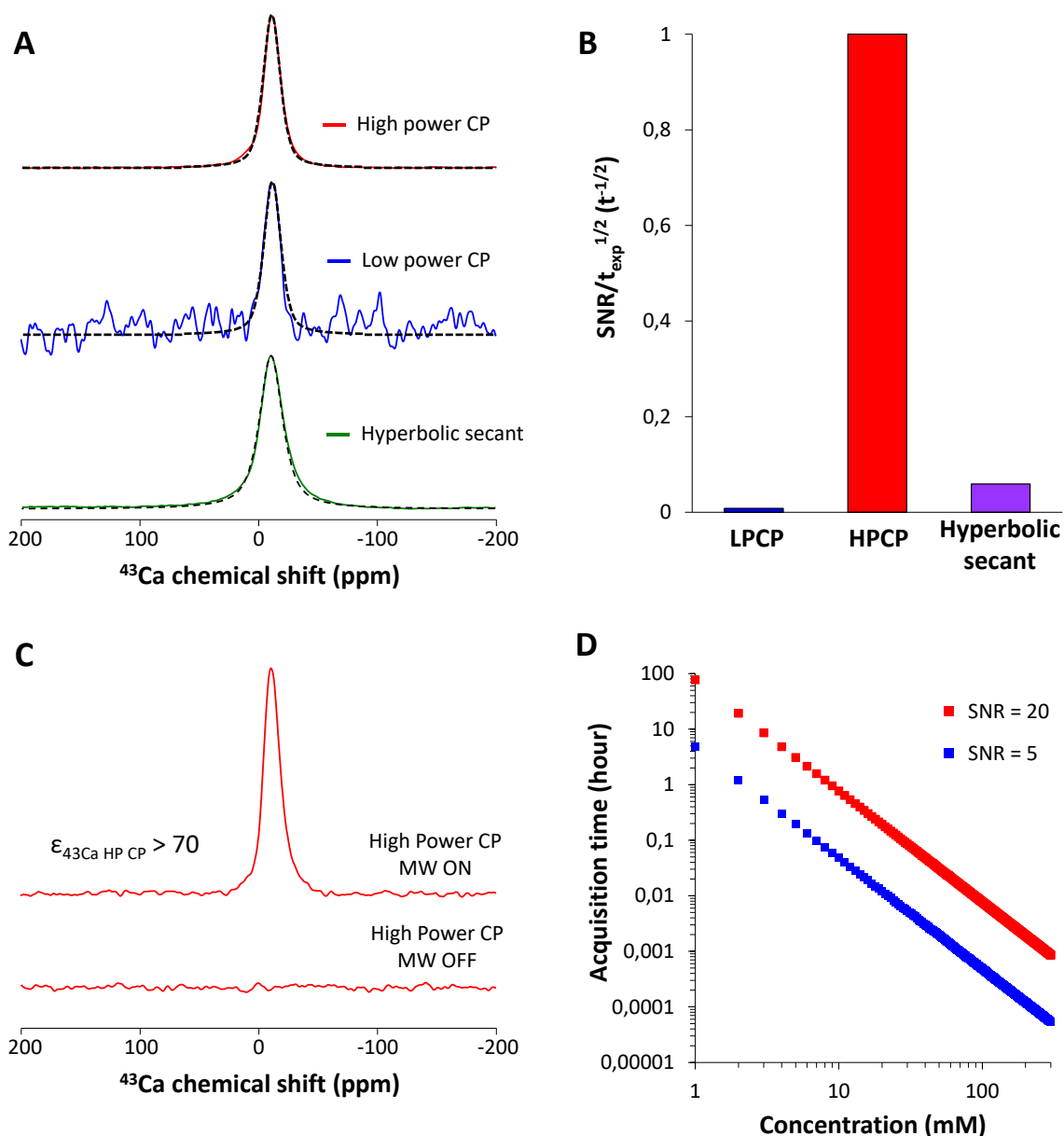


Figure 1. (A) ⁴³Ca DNP MAS NMR normalized spectra of Ca-H₂O sample acquired with HP CP (red), LP CP (blue) and HS (green) sequences. Fitting of the central transition is depicted in dashed lines. (B) Normalized sensitivity constant (see text) for ⁴³Ca DNP NMR spectra of Ca-H₂O sample acquired in different conditions (all sequences were performed with MW on). (C) Comparison of ⁴³Ca HP CP DNP NMR spectra of Ca-H₂O sample with (top) and without (bottom) MW allowing the

estimation of the enhancement DNP factor: $\varepsilon_{43\text{Ca HP CP}} > 70$. (D) Theoretical acquisition time of a 1D ^{43}Ca DNP MAS NMR spectrum for SNR = 20 (red squares) and SNR = 5 (blue squares) in HP CP conditions according to Ca^{2+} concentration (for ^{43}Ca -labelled samples at 62,2%).

The analysis of the spinning side band manifold of 1D CP HP ^{43}Ca DNP MAS NMR spectrum of Ca-H₂O sample depends on the 1st order quadrupolar coupling, hence allowing the estimation of the C_Q value⁶². The corresponding fitting leads to an average C_Q value ranging from 0.65 to 1.05 MHz (Figure 2). Modeling with a C_Q of 0.65 MHz correctly describes the overall width of the spinning side bands manifold. However, the relative intensities of the first side bands are overestimated (Figure 2B). Moreover, we cannot exclude that ^{43}Ca irradiation is not covering the whole spectrum leading to an underestimation of the farthest side bands. On the other hand, modeling with $C_Q = 1.05$ MHz leads to a good accuracy for the first four spinning sidebands and an overestimation of the farthest side bands (Figure 2A). Interestingly, these values are lower compared to those determined for ^{43}Ca in inorganic crystalline solids (around 1–4 MHz³⁶) and are in agreement with the absence of visible 2nd order quadrupolar lineshape for the central transition in our conditions ($B_0 = 9.4$ T). Again, this observation is in line with the presence of a relative symmetric environment around Ca^{2+} and/or residual dynamics at 100K.

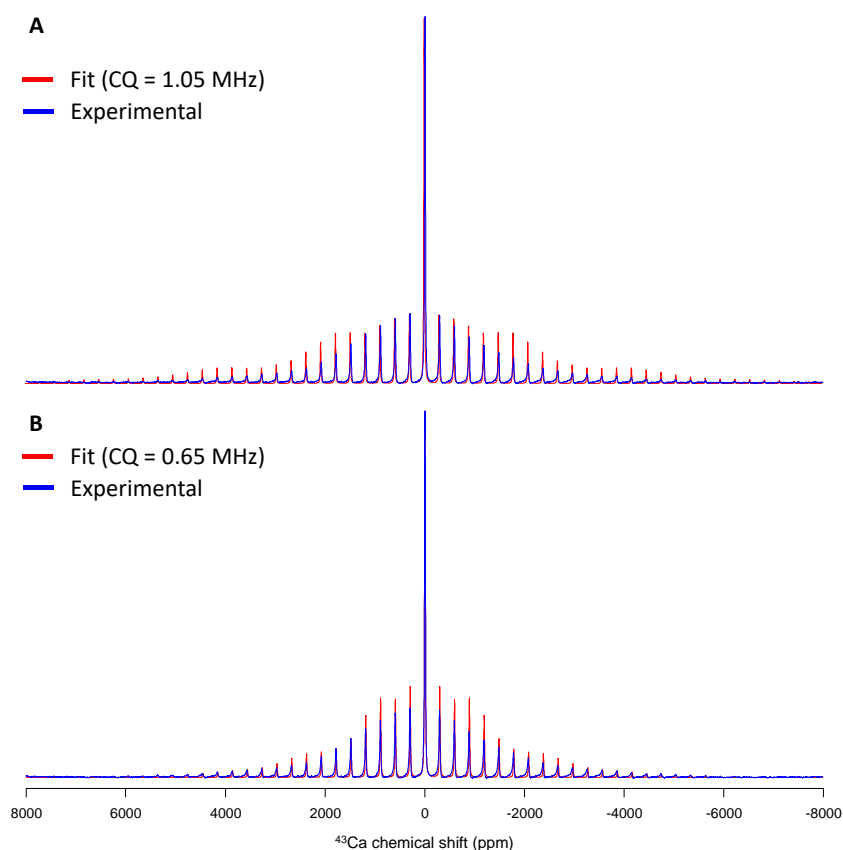


Figure 2. Experimental ^{43}Ca HP CP DNP MAS NMR spectrum of Ca-H₂O vitrified solution with the corresponding fittings using $C_Q = 1.05$ (A) and 0.65 MHz (B). η_Q was set at 0.75.

Calcium ion complexed with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

EDTA is known to be a strong complexing agent for many cations including Ca^{2+} . In particular, complexation with EDTA occurs in a 1:1 ratio with the metallic cation and induces a 6-fold coordination⁶³. Figure 3A displays the ^{43}Ca DNP NMR spectrum of Ca-EDTA sample ($[\text{EDTA}]/[\text{Ca}^{2+}] = 1/2$) recorded with HP CP conditions. The spectrum exhibits two resonances respectively corresponding to Ca^{2+} complexed by EDTA ($\delta_{^{43}\text{Ca}} = 23.7$ ppm; FWHM = 20.5 ppm) and Ca^{2+} complexed by water molecules ($\delta_{^{43}\text{Ca}} = -8.5$ ppm; FWHM = 20.2 ppm). The latter resonance is similar to one observed in the Ca- H_2O solutions. Also in this case, the HP CP condition was found to be more efficient (SNR = 162 within 275 min of acquisition time). The absence of 2nd order quadrupolar lineshape for the central transition of Ca-EDTA sample suggests the presence of a symmetric environment around Ca^{2+} due to the octahedral coordination of EDTA, although residual dynamics at 100K cannot be excluded. Interestingly, both ^{43}Ca signals exhibit 1/1 relative intensities in agreement with the EDTA/ Ca^{2+} molar ratio (1/2). Here, cross polarization appears to be quantitative probably due to a homogenous distribution of the polarizing agent in the glassy solution leading to efficient $^1\text{H} \rightarrow ^{43}\text{Ca}$ CP transfer.

As in the Ca- H_2O case, it is possible to estimate the C_Q for the Ca-EDTA sample by fitting the spinning side manifold with 1st order quadrupolar coupling. Figure 3B displays the best fit for which two components were used corresponding to Ca^{2+} complexed with EDTA or water molecules. The analysis provides C_Q values of 0.65 ± 0.1 MHz for both sites (Figure 3B), in good agreement with the C_Q values estimated for Ca- H_2O sample and slightly lower than solid $\text{Ca}_2(\text{EDTA}) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ determined from a previous study⁶⁴. Such low C_Q value found for Ca^{2+} complexed with EDTA reflects the highly symmetric environment generated by EDTA complexation.

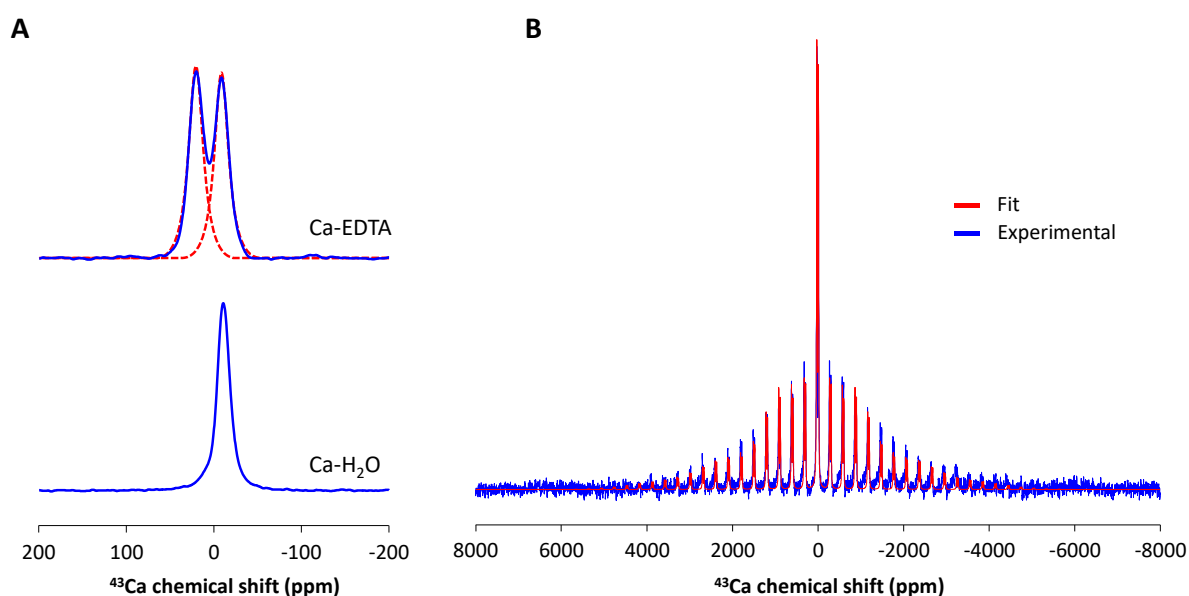


Figure 3. (A) ^{43}Ca HP CP DNP MAS NMR spectrum of Ca-EDTA (top) and Ca- H_2O (bottom) samples. Fitting of the central transition is depicted in red dashed lines (B) Best fit (red) of the spinning side band manifold of Ca-EDTA (blue) using two components at 23.7 and -8.5 ppm and $C_Q = 0.65$ MHz for both. η_Q was set at 0.70 for both components.

Calcium ion complexed with L-aspartic acid (L-Asp)

In order to mimic Ca^{2+} interaction with acidic proteins involved in biomineralization processes, we studied calcium ion complexation with L-Asp, a key amino acid found in large amount in mineralizing proteins. We investigated two different molar ratios in solution: $[\text{L-Asp}]/[\text{Ca}^{2+}] = 1/2$ (Ca-Asp50) and $1/1$ (Ca-Asp100). We have recently shown that in solution one calcium ion binds with one aspartic acid molecule with a supposed preferential complexation site on the C_1 from aspartic acid⁶⁵. Indeed, after addition of L-Asp to an aqueous solution of Ca^{2+} , calcium ion potentiometry measurement shows the reduction of free Ca^{2+} concentration in a 1/1 proportion respective to the added L-Asp amount.

The ^{43}Ca DNP MAS NMR spectra of Ca-Asp50, Ca-Asp100 and Ca- H_2O samples (HP CP conditions) are shown in Figure 4A. Surprisingly, the spectra of the three samples were found to be very similar with a ^{43}Ca chemical shift of -9.6 ppm and a linewidth of 20.2 ppm for Ca-Asp50 and Ca-Asp100 samples. Only a slight increase of the ^{43}Ca chemical shift (< 1 ppm, see Fig. SI 4) is observed when Ca^{2+} is complexed to L-Asp when compared to Ca- H_2O . It seems that the complexation to L-Asp does not modify significantly the ^{43}Ca chemical shift of the central transition as already noticed using ^{43}Ca solution NMR⁶⁴. Similarly to the previous samples, Ca-Asp50 and Ca-Asp100 samples exhibit a symmetrical lineshape due to weak quadrupolar coupling induced by a high symmetrical environment and/or dynamical effects. In a similar way, the evaluation of the quadrupolar constant C_Q through the fitting of the spinning side manifold of Ca-Asp100 leads to value ranging between 0.6 and 0.85 MHz (Figure 4B).

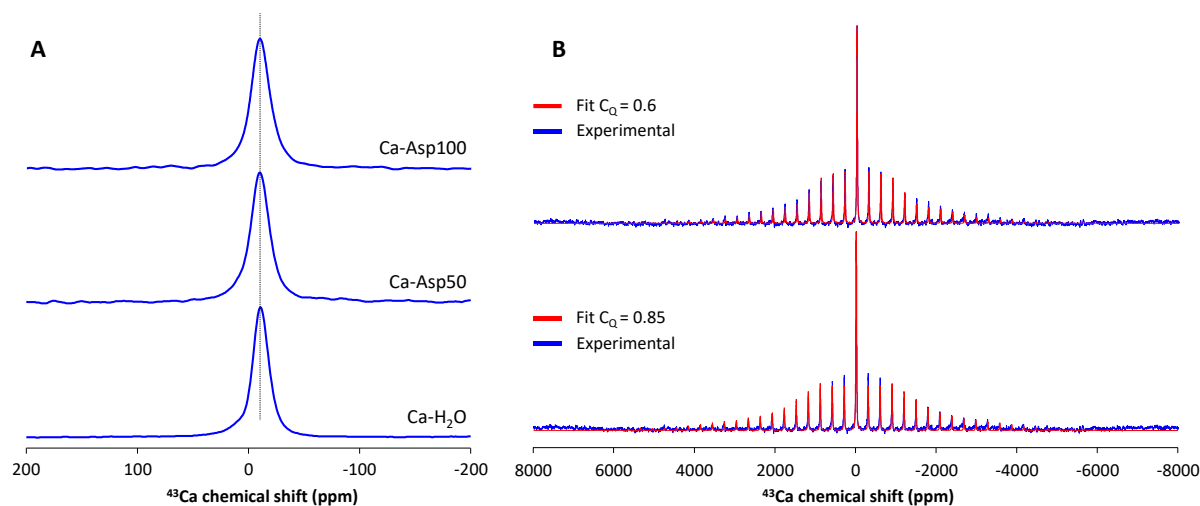


Figure 4. (A) ^{43}Ca HP CP DNP MAS NMR spectrum of Ca-Asp100 (top), Ca-Asp50 (middle), Ca- H_2O (bottom). (B) Experimental ^{43}Ca DNP MAS NMR spectrum of Ca-Asp100 sample with corresponding fittings using $C_Q = 0.6$ and 0.85 MHz.

Numerical simulations of calcium ion complexation

In order to rationalize the low C_Q values observed and their relationships with symmetrical chemical environments around Ca^{2+} , we undertook numerical simulations of calcium ion complexation with water, EDTA and L-Asp (Figure 5 and Fig. SI 5 to SI 8).

In presence of water, Ca^{2+} molecules tend to adopt a 6- to 7-fold coordination (when considering Ca—O distances below 2.7 Å) with an average Ca—OH₂ distance of 2.43 Å (with values ranging from 2.32 to 2.66 Å). Such arrangements of water ligands lead to C_Q values ranging between 2.17 and 1.34 MHz (Fig. SI 5). If these values are rather small, they are larger than the C_Q average value determined for Ca-H₂O sample by ⁴³Ca DNP NMR (1.05 to 0.65 MHz). This discrepancy suggests the presence of residual dynamics even at 100 K impacting the measured C_Q value.

In presence of EDTA, known as a strong complexing agent toward Ca^{2+} , molecular dynamic simulation shows that Ca^{2+} tends to adopt a 6-fold coordination with the complexing groups (N and COO) from EDTA and 2 additional water molecules brings the total coordination up to 8. Such complexation mode is imposing a relatively high symmetrical environment that is inducing relatively low C_Q values ranging between 1.3 and 0.92 MHz (Fig. SI 6). Once again, calculated values are slightly higher than measured values by ⁴³Ca DNP NMR (0.65 MHz) also pleading for the presence of residual dynamics at 100 K.

Finally, we investigated the complexation by L-Asp that is known to form 1/1 complexes with Ca^{2+} ⁶⁴. When considering coordination with C₁ group, Ca^{2+} tends to adopt a 6- to 7-fold coordination where Ca^{2+} binds to one single oxygen from C₁OO⁻ group. The coordination sphere is then completed by 5- to 6-water molecules. It should be noticed that the complexation with 6 water molecules (total coordination of 7) seems more stable and leads to smaller C_Q values (Fig. SI 7). If we consider coordination with the C₄ group, stable Ca^{2+} complexes of similar energies are found, however the binding mode is slightly different with a bidentate coordination of Ca^{2+} with C₄OO⁻ group, the coordination being completed by 4- to 5-water molecules. As observed for the coordination by C₁ group, the complexation with the maximal coordination (7 with 5 water molecules) looks more stable and leads to smaller C_Q values (Fig. SI 8). Importantly, the C_Q values obtained from numerical simulation are found in the same range for the two distinct binding modes with L-Asp: from 2.55 to 1.29 MHz for C₁ coordination and from 2.42 to 1.31 MHz for C₄ coordination. Again, calculated values are higher than measured values by ⁴³Ca DNP NMR (0.6-0.85 MHz).

From these numerical simulations, it seems that the symmetry adopted by Ca^{2+} complexes in solution is not the only reason of low C_Q values determined by ⁴³Ca DNP NMR. The presence of residual dynamics at 100 K averaging the quadrupolar couplings plays certainly a role. All these complexes have water molecules in common that could be involved in the residual dynamics at low temperature. Such residual dynamics can concern different type of motions such as vibrations of ligands around their position or chemical exchange with free molecules from the solution. However, this feature induces that the ⁴³Ca central transition of the investigated complexes can behave as fictitious spin ½ in our CP conditions, and explains the superior efficiency of HP CP conditions vs LP CP conditions that are usually preferred for CP MAS experiments involving quadrupolar nuclei.

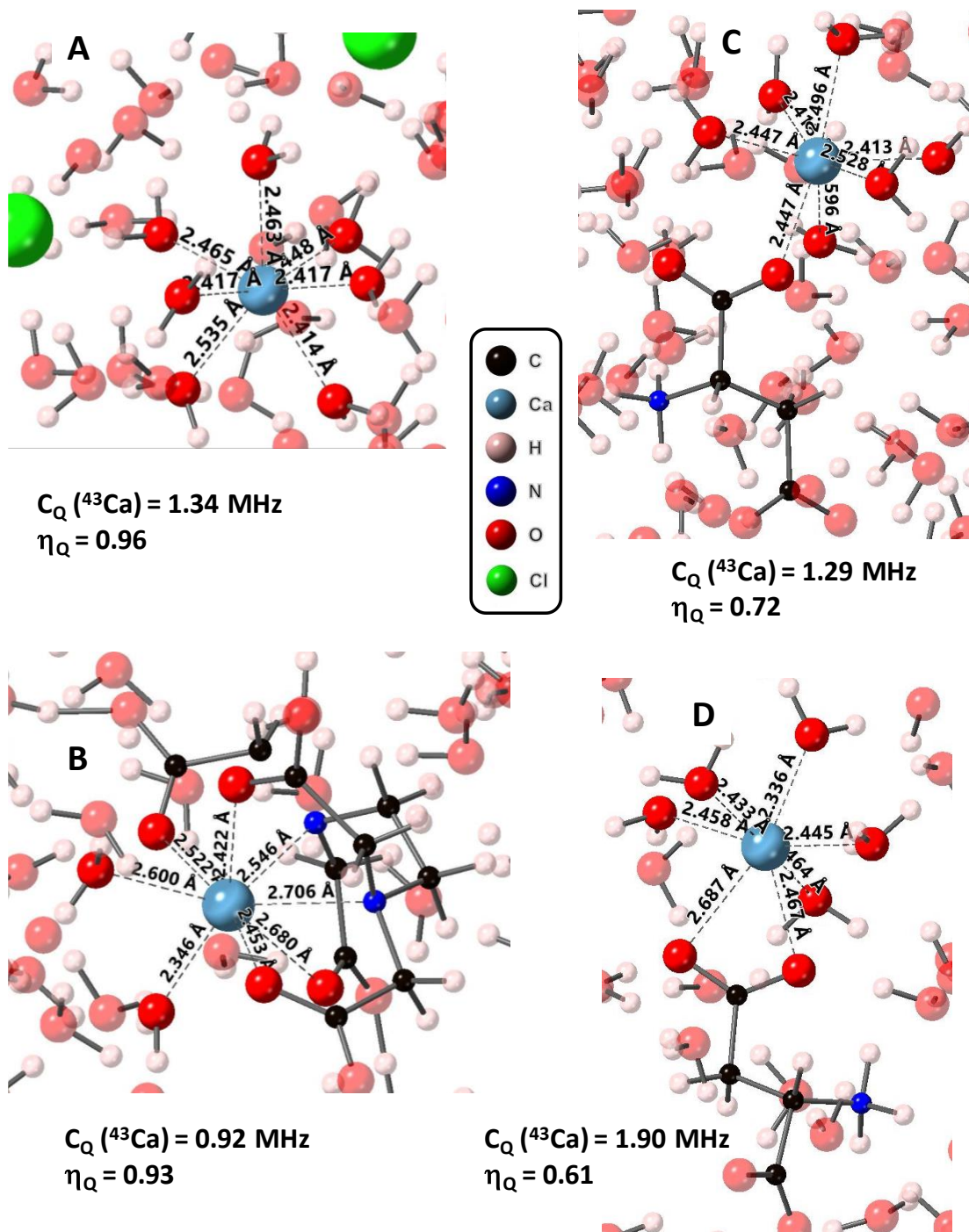


Figure 5. Low energy configurations obtained by DFT and corresponding calculated ^{43}Ca quadrupolar parameters for (A) Ca^{2+} in interaction with water molecules, (B) Ca^{2+} in interaction with EDTA and water molecules, (C) L-Asp in interaction through C_1OO^- with Ca^{2+} , (D) L-Asp in interaction through C_4OO^- with Ca^{2+} . Characteristic distances around Ca^{2+} are shown.

Two-dimensional ^1H - ^{43}Ca DNP MAS NMR experiments

The sensitivity of ^{43}Ca DNP MAS NMR experiments achieved using the HP CP conditions allowed ^1H - ^{43}Ca heteronuclear correlations (HetCor) experiments to be carried out on the investigated frozen solutions (Figure 6). For the Ca-H₂O solution (Figure 6A), the HetCor experiment shows the presence

of a single correlation peak, indicating the presence of an interaction between ^{43}Ca ions and the protons of the coordinated water molecules, identified by a ^1H signal of 6.3 ppm. Interestingly, the same experiment performed on the Ca-EDTA solution shows the presence of two distinct correlation peaks (Figure 6B). One peak, very similar to the one observed in the Ca- H_2O sample, indicates the proximity of calcium ions to the coordinated water molecules (^1H chemical shift = 6.3 ppm). The second peak reveals an interaction between calcium ions and CH_2 protons of EDTA (^1H chemical shift = 5 ppm). Overall, this experiment confirms that water and EDTA both interact with calcium ions in the first coordination sphere. Finally, the Ca-Asp100 sample (Figure 6C) exhibits a distorted correlation resonance with a maximum at 6.3 ppm corresponding to water molecules and a shoulder down to 2.5 ppm assigned to CH_2 and CH from L-aspartic acid. Such observation is consistent with ^1H - ^{13}C DNP MAS NMR study of CaCO_3 formation induced by L-Asp⁶⁴.

Thus, two-dimensional ^1H - ^{43}Ca DNP MAS NMR experiments of vitrified solutions allow the characterization of the spatial proximities between calcium ion and small ligands for Ca^{2+} complexes. Such approach could also allow the study of more challenging complexation phenomenon including the characterization of calcium binding sites within proteins.

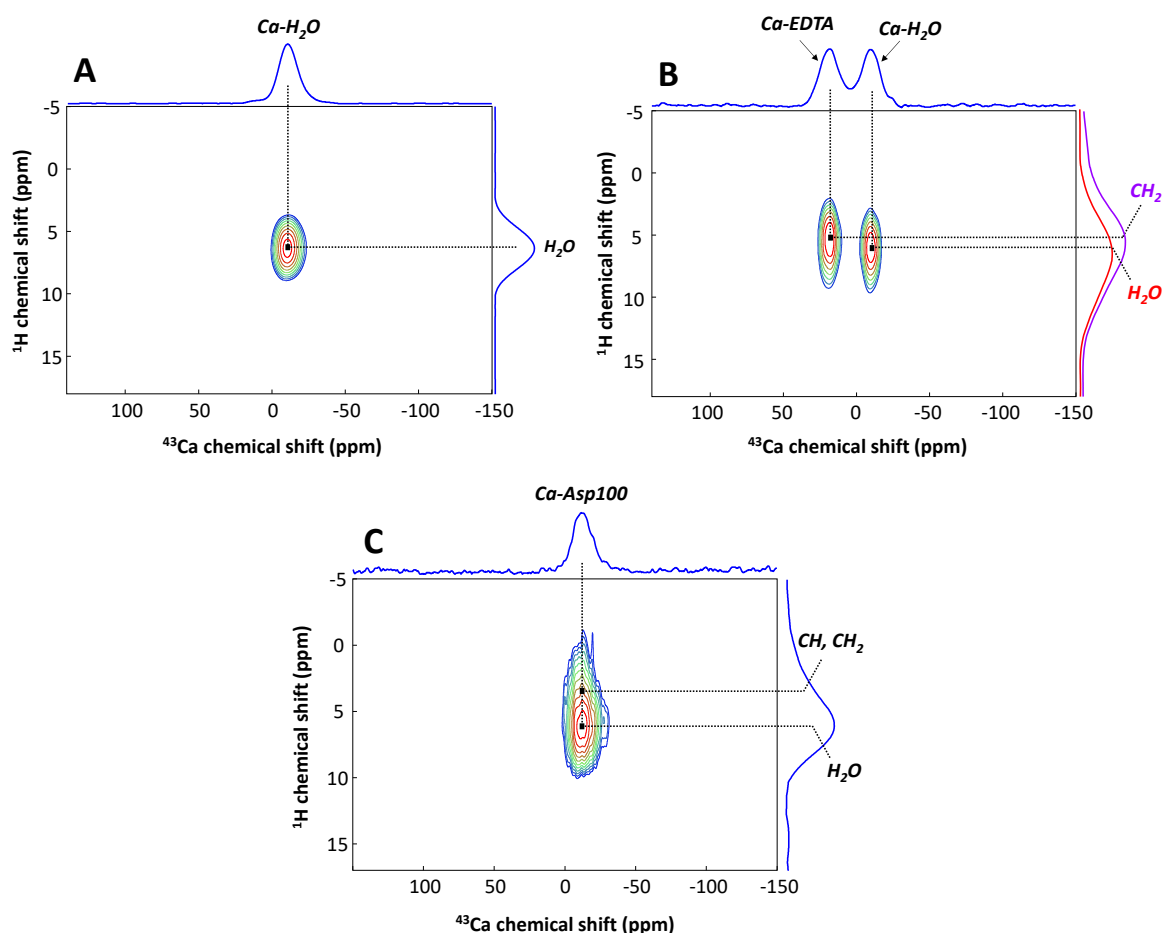


Figure 6. (A) ^1H - ^{43}Ca HetCor spectra of (A) Ca- H_2O , (B) Ca-EDTA and (C) Ca-Asp100. For Ca-EDTA, the two different ^1H projections are shown to highlight the distinct protonated environment from Ca^{2+} - water (red line) and Ca^{2+} - EDTA complexes (purple line).

Conclusion

Usually, ^{43}Ca solution NMR can bring dynamical details to study calcium ion complexation mechanisms. However structural informations are somehow limited due to chemical exchange of organic ligands. Here we have shown that ^{43}Ca MAS DNP NMR analysis of frozen solutions provides structural insights on calcium-ion complexes. In our conditions, Ca^{2+} ions complexed by water molecules, EDTA or L-aspartic acid exhibit rather low quadrupolar couplings that can be explained by a rather high symmetrical environment coupled to the presence of residual dynamics around calcium ion at 100 K. As a consequence, ^1H - ^{43}Ca cross polarization NMR experiments to detect ^{43}Ca central transition are much more efficient (~ 120 more efficient) when high-power $\nu_{\text{RF}}(^{43}\text{Ca})$ conditions (“spin $\frac{1}{2}$ condition”) are used instead of the low-power conditions typically used for quadrupolar nuclei. Using these CP conditions, and with the help of ^{43}Ca -labelling, 2D ^1H - ^{43}Ca HetCor spectra can be readily recorded highlighting the different Ca^{2+} —ligand interactions in solutions.

This approach could be used to study more complex interactions such as Ca^{2+} with proteins to understand biological functions related to calcium complexation. Moreover, other complexed metal ions in solution could be studied by this approach that combines distinct advantages in terms of sensitivity: (i) significant enhancement from DNP, (ii) reduced dynamics allowing the use of CP as a sensitivity enhancement technique, (iii) relatively high symmetrical environment combined to residual dynamics leading to the averaging of the quadrupolar interaction and thus leading to efficient high-power CP condition. Importantly, using HP CP conditions seems to be an effective way of exclusively observing relatively symmetrical ^{43}Ca environment while filtering out more rigid and/or anisotropic ^{43}Ca sites characterized by larger quadrupolar constants, for which these conditions are unable to provide efficient cross polarization transfer.

These considerations, combined with the ability of enhancing ^{43}Ca NMR sensitivity and of reducing calcium ions mobility, suggest that this approach might be a promising way for accessing atomic-level details on the first steps of biomineralization processes involving the so-called prenucleation clusters – described as nanometric, (meta)stable and highly dynamical Ca^{2+} -binded entities^{20,22} – possibly answering longstanding questions about fundamental mechanisms of self-assembly in biominerals.

Acknowledgments

TA and TG acknowledge NTU-CNRS “Excellence Science” Joint Research Program for funding.

Theoretical calculations were performed using HPC resources from GENCI-IDRIS (Grant 097535).

GM acknowledges funding from the European Research Council (ERC) under the European Union Horizon 2020 research and innovation programme (Grant Agreement No. 758498).

Bibliography

- (1) Anderson, J. S. Chemistry on the Earth. *J. Proc. R. Soc. New South Wales* 1942, 76 (30), 329–344.
- (2) Fleischer, M. The Abundance and Distribution of the Chemical Elements in the Earth's Crust. *J. Chem. Educ.* 1954, 31 (9), 446. <https://doi.org/10.1021/ed031p446>.
- (3) Sanders, D.; Brownlee, C.; Harper, J. F. Communicating with Calcium. *Plant Cell* 1999, 11 (4), 691–706. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.691>.
- (4) Ma, X.; Warnier, M.; Raynard, C.; Ferrand, M.; Kirsh, O.; Defosse, P.-A.; Martin, N.; Bernard, D. The Nuclear Receptor RXRA Controls Cellular Senescence by Regulating Calcium Signaling. *Aging Cell* 2018, 17 (6), e12831. <https://doi.org/10.1111/accel.12831>.
- (5) Kuo, I. Y.; Ehrlich, B. E. Signaling in Muscle Contraction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015, 7 (2), a006023. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006023>.
- (6) Kahil, K.; Weiner, S.; Addadi, L.; Gal, A. Ion Pathways in Biomineralization: Perspectives on Uptake, Transport, and Deposition of Calcium, Carbonate, and Phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* 2021, 143 (50), 21100–21112. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c09174>.
- (7) Tang, S.; Deng, X.; Jiang, J.; Kirberger, M.; Yang, J. J. Design of Calcium-Binding Proteins to Sense Calcium. *Molecules* 2020, 25 (9), 2148. <https://doi.org/10.3390/molecules25092148>.
- (8) Szent-Györgyi, A. G. Calcium Regulation of Muscle Contraction. *Biophys. J.* 1975, 15 (7), 707–723.
- (9) Hasselbach, W. Relaxing Factor and the Relaxation of Muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1964, 14, 167-1N2. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(64\)80006-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(64)80006-7).
- (10) Ebashi, S.; Endo, M. Calcium and Muscle Contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1968, 18, 123–183. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(68\)90023-0](https://doi.org/10.1016/0079-6107(68)90023-0).
- (11) Reid, I. R.; Birstow, S. M.; Bolland, M. J. Calcium and Cardiovascular Disease. *Endocrinol. Metab.* 2017, 32 (3), 339–349. <https://doi.org/10.3803/EnM.2017.32.3.339>.
- (12) Mattson, M. P. Calcium and Neurodegeneration. *Aging Cell* 2007, 6 (3), 337–350. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00275.x>.
- (13) Alberic, M.; Caspi, E.; Bennet, M. A.; Ajili, W.; Nassif, N.; Azaïs, T.; Berner, A.; Fratzl, P.; Zolotoyabko, E.; Bertinetti, L.; Politi, Y. The Interplay between Calcite, Amorphous Calcium Carbonate and Intra-Crystalline Organics in Sea Urchin Skeletal Elements. *Cryst. Growth Des.* 2018, 18 (4), 2189. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01622>.
- (14) Gilbert, P. U. P. A.; Bergmann, K. D.; Boekelheide, N.; Tambutté, S.; Mass, T.; Marin, F.; Adkins, J. F.; Erez, J.; Gilbert, B.; Knutson, V.; Cantine, M.; Hernández, J. O.; Knoll, A. H. Biomineralization: Integrating Mechanism and Evolutionary History. *Sci. Adv.* 2022, 8 (10), eabl9653. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl9653>.
- (15) Zapanta LeGeros, R. Apatites in Biological Systems. *Prog. Cryst. Growth Charact.* 1981, 4 (1), 1–45. [https://doi.org/10.1016/0146-3535\(81\)90046-0](https://doi.org/10.1016/0146-3535(81)90046-0).
- (16) Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Glimcher, M. J. Bone Mineral: Update on Chemical Composition and Structure. *Osteoporos. Int.* 2009, 20 (6), 1013–1021. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-0860-y>.
- (17) Thompson, V. P.; Silva, N. R. F. A. 1 - Structure and Properties of Enamel and Dentin. In *Non-Metallic Biomaterials for Tooth Repair and Replacement*; Vallittu, P., Ed.; Woodhead Publishing

- Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2013; pp 3–19. <https://doi.org/10.1533/9780857096432.1.3>.
- (18) Marin, F.; Luquet, G. Unusually Acidic Proteins in Biomineralization. In *Handbook of Biomineralization*; John Wiley & Sons, Ltd, 2007; pp 273–290. <https://doi.org/10.1002/9783527619443.ch16>.
- (19) Boskey, A. L.; Villarreal-Ramirez, E. Intrinsically Disordered Proteins and Biomineralization. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 2016, 52–54, 43–59. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.01.007>.
- (20) Gebauer, D.; Völkel, A.; Cölfen, H. Stable Prenucleation Calcium Carbonate Clusters. *Science* 2008, 322 (5909), 1819–1822. <https://doi.org/10.1126/science.1164271>.
- (21) Dey, A.; Bomans, P. H. H.; Müller, F. A.; Will, J.; Frederik, P. M.; With, G. de; Sommerdijk, N. A. J. M. The Role of Prenucleation Clusters in Surface-Induced Calcium Phosphate Crystallization. *Nat. Mater.* 2010, 9 (12), 1010–1014. <https://doi.org/10.1038/nmat2900>.
- (22) Habraken, W. J. E. M.; Tao, J.; Brylka, L. J.; Friedrich, H.; Bertinetti, L.; Schenk, A. S.; Verch, A.; Dmitrovic, V.; Bomans, P. H. H.; Frederik, P. M.; Laven, J.; Schoot, P. van der; Aichmayer, B.; With, G. de; DeYoreo, J. J.; Sommerdijk, N. A. J. M. Ion-Association Complexes Unite Classical and Non-Classical Theories for the Biomimetic Nucleation of Calcium Phosphate. *Nat. Commun.* 2013, 4 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms2490>.
- (23) Lee, J.; Yang, J.; Kwon, S. G.; Hyeon, T. Nonclassical Nucleation and Growth of Inorganic Nanoparticles. *Nat. Rev. Mater.* 2016, 1 (8), 1–16. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.34>.
- (24) Demichelis, R.; Raiteri, P.; Gale, J. D.; Quigley, D.; Gebauer, D. Stable Prenucleation Mineral Clusters Are Liquid-like Ionic Polymers. *Nat. Commun.* 2011, 2 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms1604>.
- (25) Leroy, C.; Bryce, D. L. Recent Advances in Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Exotic Nuclei. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2018, 109, 160–199. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2018.08.002>.
- (26) Bryce, D. L. Calcium Binding Environments Probed by ⁴³Ca NMR Spectroscopy. *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003 2010, 39 (37), 8593–8602. <https://doi.org/10.1039/c0dt00416b>.
- (27) Cole, W. H. *Comparative Animal Physiology*. C. Ladd Prosser, Ed. Philadelphia: Saunders, 1950. 888 Pp. \$12.50. *Science* 1951, 113 (2938), 456–457. <https://doi.org/10.1126/science.113.2938.456.b>.
- (28) Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* 2006, 27, 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- (29) Bold, A. M. Determination of Calcium in Plasma; A Review of Some Modern Methods. *Ann. Clin. Biochem.* 1970, 7 (5), 131–135. <https://doi.org/10.1177/000456327000700505>.
- (30) Culkin, F.; Cox, R. A. Sodium, Potassium, Magnesium, Calcium and Strontium in Sea Water. *Deep Sea Res. Oceanogr. Abstr.* 1966, 13 (5), 789–804. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(76\)90905-0](https://doi.org/10.1016/0011-7471(76)90905-0).
- (31) Thompson, M. E.; Ross, J. W. Calcium in Sea Water by Electrode Measurement. *Science* 1966, 154 (3757), 1643–1644. <https://doi.org/10.1126/science.154.3757.1643>.
- (32) Becker, W.; Bhattiprolu, K. C.; Gubensäk, N.; Zangger, K. Investigating Protein–Ligand Interactions by Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemphyschem* 2018, 19 (8), 895–906. <https://doi.org/10.1002/cphc.201701253>.

- (33) Parello, J.; Lilja, H.; Cave, A.; Lindman, B. A ^{43}Ca NMR Study of the Binding of Calcium to Parvalbumins. *FEBS Lett.* 1978, 87 (2), 191–195. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80329-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80329-9).
- (34) Andersson, T.; Drakenberg, T.; Forsen, S.; Thulin, E.; Swaerd, M. Direct Observation of the Calcium- 43 NMR Signals from Calcium(2+) Bound to Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104 (2), 576–580. <https://doi.org/10.1021/ja00366a035>.
- (35) Wong, A.; Laurencin, D.; Wu, G.; Dupree, R.; Smith, M. E. An Ab Initio Quantum Chemical Investigation of ^{43}Ca NMR Interaction Parameters for the Ca^{2+} Sites in Organic Complexes and in Metalloproteins. *J. Phys. Chem. A* 2008, 112 (40), 9807–9813. <https://doi.org/10.1021/jp801015y>.
- (36) Gervais, C.; Laurencin, D.; Wong, A.; Pourpoint, F.; Labram, J.; Woodward, B.; Howes, A. P.; Pike, K. J.; Dupree, R.; Mauri, F.; Bonhomme, C.; Smith, M. E. New Perspectives on Calcium Environments in Inorganic Materials Containing Calcium–Oxygen Bonds: A Combined Computational–Experimental ^{43}Ca NMR Approach. *Chem. Phys. Lett.* 2008, 464 (1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.09.004>.
- (37) Kentgens, A. P. M.; Verhagen, R. Advantages of Double Frequency Sweeps in Static, MAS and MQMAS NMR of Spin $I=3/2$ Nuclei. *Chem. Phys. Lett.* 1999, 300 (3), 435–443. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(98\)01402-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)01402-X).
- (38) Siegel, R.; Nakashima, T. T.; Wasylishen, R. E. Sensitivity Enhancement of MQMAS NMR Spectra of Spin $3/2$ Nuclei Using Hyperbolic Secant Pulses. *Chem. Phys. Lett.* 2005, 403 (4–6), 353–358.
- (39) Laurencin, D.; Li, Y.; Duer, M. J.; Iuga, D.; Gervais, C.; Bonhomme, C. A ^{43}Ca Nuclear Magnetic Resonance Perspective on Octacalcium Phosphate and Its Hybrid Derivatives. *Magn. Reson. Chem. MRC* 2021, 59 (9–10), 1048–1061. <https://doi.org/10.1002/mrc.5149>.
- (40) Bonhomme, C.; Wang, X.; Hung, I.; Gan, Z.; Gervais, C.; Sassoey, C.; Rimsza, J.; Du, J.; Smith, M. E.; Hanna, J. V.; Sarda, S.; Gras, P.; Combes, C.; Laurencin, D. Pushing the Limits of Sensitivity and Resolution for Natural Abundance ^{43}Ca NMR Using Ultra-High Magnetic Field (35.2 T). *Chem. Commun.* 2018, 54 (69), 9591–9594. <https://doi.org/10.1039/C8CC05193C>.
- (41) Singer, J. W.; Yazaydin, A. Ö.; Kirkpatrick, R. J.; Bowers, G. M. Structure and Transformation of Amorphous Calcium Carbonate: A Solid-State ^{43}Ca NMR and Computational Molecular Dynamics Investigation. *Chem. Mater.* 2012, 24 (10), 1828–1836. <https://doi.org/10.1021/cm300389q>.
- (42) Ajili, W.; Laurent, G.; Menguy, N.; Gansmuller, A.; Huchette, S.; Auzoux-Bordenave, S.; Nassif, N.; Azaïs, T. Chemical Heterogeneities within the Disordered Mineral Domains of Aragonite Platelets in Nacre from the European Abalone *Haliotis Tuberculata*. *J. Phys. Chem. C* 2020, 124 (26), 14118. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c00280>.
- (43) Xu, J.; Zhu, P.; Gan, Z.; Sahar, N.; Tecklenburg, M.; Morris, M. D.; Kohn, D. H.; Ramamoorthy, A. Natural-Abundance ^{43}Ca Solid-State NMR Spectroscopy of Bone. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 (33), 11504–11509. <https://doi.org/10.1021/ja101961x>.
- (44) Wong, A.; Laurencin, D.; Dupree, R.; Smith, M. E. Two-Dimensional ^{43}Ca – ^1H Correlation Solid-State NMR Spectroscopy. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 2009, 35 (1), 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.ssnmr.2008.11.002>.
- (45) Wang, Y.; Von Euw, S.; Fernandes, F. M.; Cassaignon, S.; Selmane, M.; Laurent, G.; Pehau-ArnauDET, G.; Coelho, C.; Bonhomme-Coury, L.; Giraud-Guille, M.-M.; Babonneau, F.; Azaïs, T.; Nassif, N. Water-Mediated Structuring of Bone Apatite. *Nat. Mater.* 2013, 12 (12), 1144–1153. <https://doi.org/10.1038/nmat3787>.

- (46) Lee, D.; Leroy, C.; Crevant, C.; Bonhomme-Coury, L.; Babonneau, F.; Laurencin, D.; Bonhomme, C.; De Paëpe, G. Interfacial Ca 2+ Environments in Nanocrystalline Apatites Revealed by Dynamic Nuclear Polarization Enhanced 43 Ca NMR Spectroscopy. *Nat. Commun.* 2017, 8 (1), 14104. <https://doi.org/10.1038/ncomms14104>.
- (47) Rossini, A. J.; Zagdoun, A.; Lelli, M.; Lesage, A.; Copéret, C.; Emsley, L. Dynamic Nuclear Polarization Surface Enhanced NMR Spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* 2013, 46 (9), 1942–1951. <https://doi.org/10.1021/ar300322x>.
- (48) Lesage, A.; Lelli, M.; Gajan, D.; Caporini, M. A.; Vitzthum, V.; Miéville, P.; Alauzun, J.; Roussey, A.; Thieuleux, C.; Mehdi, A.; Bodenhausen, G.; Coperet, C.; Emsley, L. Surface Enhanced NMR Spectroscopy by Dynamic Nuclear Polarization. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 (44), 15459–15461. <https://doi.org/10.1021/ja104771z>.
- (49) Sauvée, C.; Rosay, M.; Casano, G.; Aussenac, F.; Weber, R. T.; Ouari, O.; Tordo, P. Highly Efficient, Water-Soluble Polarizing Agents for Dynamic Nuclear Polarization at High Frequency. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52 (41), 10858–10861. <https://doi.org/10.1002/anie.201304657>.
- (50) Vega, A. J. CPMAS of Quadrupolar S = 32 Nuclei. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 1992, 1 (1), 17–32. [https://doi.org/10.1016/0926-2040\(92\)90006-U](https://doi.org/10.1016/0926-2040(92)90006-U).
- (51) Ashbrook, S. E.; Wimperis, S. Spin-Locking of Half-Integer Quadrupolar Nuclei in Nuclear Magnetic Resonance of Solids: Second-Order Quadrupolar and Resonance Offset Effects. *J. Chem. Phys.* 2009, 131 (19), 194509. <https://doi.org/10.1063/1.3263904>.
- (52) AMOUREUX, J.-P.; PRUSKI, M. Theoretical and Experimental Assessment of Single- and Multiple-Quantum Cross-Polarization in Solid State NMR. *Mol. Phys.* 2002, 100 (10), 1595–1613. <https://doi.org/10.1080/00268970210125755>.
- (53) Barrie, P. J. Distorted Powder Lineshapes in 27 Al CP / MAS NMR Spectroscopy of Solids. *Chem. Phys. Lett.* 1993, 208 (5), 486–490. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(93\)87177-5](https://doi.org/10.1016/0009-2614(93)87177-5).
- (54) Vitzthum, V.; Miéville, P.; Carnevale, D.; Caporini, M. A.; Gajan, D.; Copéret, C.; Lelli, M.; Zagdoun, A.; Rossini, A. J.; Lesage, A.; Emsley, L.; Bodenhausen, G. Dynamic Nuclear Polarization of Quadrupolar Nuclei Using Cross Polarization from Protons: Surface-Enhanced Aluminium-27 NMR. *Chem. Commun.* 2012, 48 (14), 1988–1990. <https://doi.org/10.1039/C2CC15905H>.
- (55) Blanc, F.; Sperrin, L.; Jefferson, D. A.; Pawsey, S.; Rosay, M.; Grey, C. P. Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Natural Abundance 17O Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135 (8), 2975–2978. <https://doi.org/10.1021/ja4004377>.
- (56) Nagashima, H.; Trébosc, J.; Kon, Y.; Lafon, O.; Amoureux, J.-P. Efficient Transfer of DNP-Enhanced 1 H Magnetization to Half-Integer Quadrupolar Nuclei in Solids at Moderate Spinning Rate. *Magn. Reson. Chem. MRC* 2021, 59 (9–10), 920–939. <https://doi.org/10.1002/mrc.5121>.
- (57) Kresse, G.; Hafner, J. Ab Initio Molecular-Dynamics Simulation of the Liquid-Metal--Amorphous-Semiconductor Transition in Germanium. *Phys. Rev. B* 1994, 49 (20), 14251–14269. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.49.14251>.
- (58) Giannozzi, P.; Baroni, S.; Bonini, N.; Calandra, M.; Car, R.; Cavazzoni, C.; Ceresoli, D.; Chiarotti, G. L.; Cococcioni, M.; Dabo, I.; Corso, A. D.; Gironcoli, S. de; Fabris, S.; Fratesi, G.; Gebauer, R.; Gerstmann, U.; Gougoussis, C.; Kokalj, A.; Lazzeri, M.; Martin-Samos, L.; Marzari, N.; Mauri, F.; Mazzarello, R.; Paolini, S.; Pasquarello, A.; Paulatto, L.; Sbraccia, C.; Scandolo, S.; Sclauzero, G.; Seitsonen, A. P.; Smogunov, A.; Umari, P.; Wentzcovitch, R. M. QUANTUM ESPRESSO: A Modular and Open-Source Software Project for Quantum Simulations of Materials. *J. Phys. Condens. Matter* 2009, 21 (39), 395502. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/21/39/395502>.

- (59) Troullier, N.; Martins, J. L. Efficient Pseudopotentials for Plane-Wave Calculations. *Phys. Rev. B* 1991, 43 (3), 1993–2006. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.43.1993>.
- (60) Kleinman, L.; Bylander, D. M. Efficacious Form for Model Pseudopotentials. *Phys. Rev. Lett.* 1982, 48 (20), 1425–1428. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.48.1425>.
- (61) Pyykkö, P. Year-2017 Nuclear Quadrupole Moments. *Mol. Phys.* 2018, 116 (10), 1328–1338. <https://doi.org/10.1080/00268976.2018.1426131>.
- (62) Massiot, D.; Fayon, F.; Capron, M.; King, I.; Le Calvé, S.; Alonso, B.; Durand, J.-O.; Bujoli, B.; Gan, Z.; Hoatson, G. Modelling One- and Two-Dimensional Solid-State NMR Spectra. *Magn. Reson. Chem.* 2002, 40 (1), 70–76. <https://doi.org/10.1002/mrc.984>.
- (63) Schwarzenbach, G.; Ackermann, H. Komplexe V. Die Äthylendiamin-Tetraessigsäure. *Helv. Chim. Acta* 1947, 30 (6), 1798–1804. <https://doi.org/10.1002/hlca.19470300649>.
- (64) Burgess, K. M. N.; Xu, Y.; Leclerc, M. C.; Bryce, D. L. Alkaline-Earth Metal Carboxylates Characterized by ^{43}Ca and ^{87}Sr Solid-State NMR: Impact of Metal-Amine Bonding. *Inorg. Chem.* 2014, 53 (1), 552–561. <https://doi.org/10.1021/ic402658d>.
- (65) Ramnarain, V.; Georges, T.; Ortiz Peña, N.; Ihiawakrim, D.; Longuinho, M.; Bulou, H.; Gervais, C.; Sanchez, C.; Azais, T.; Ersen, O. Monitoring of CaCO_3 Nanoscale Structuration through Real-Time Liquid Phase Transmission Electron Microscopy and Hyperpolarized NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 2022, 144 (33), 15236–15251. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c05731>.

Supplement Information

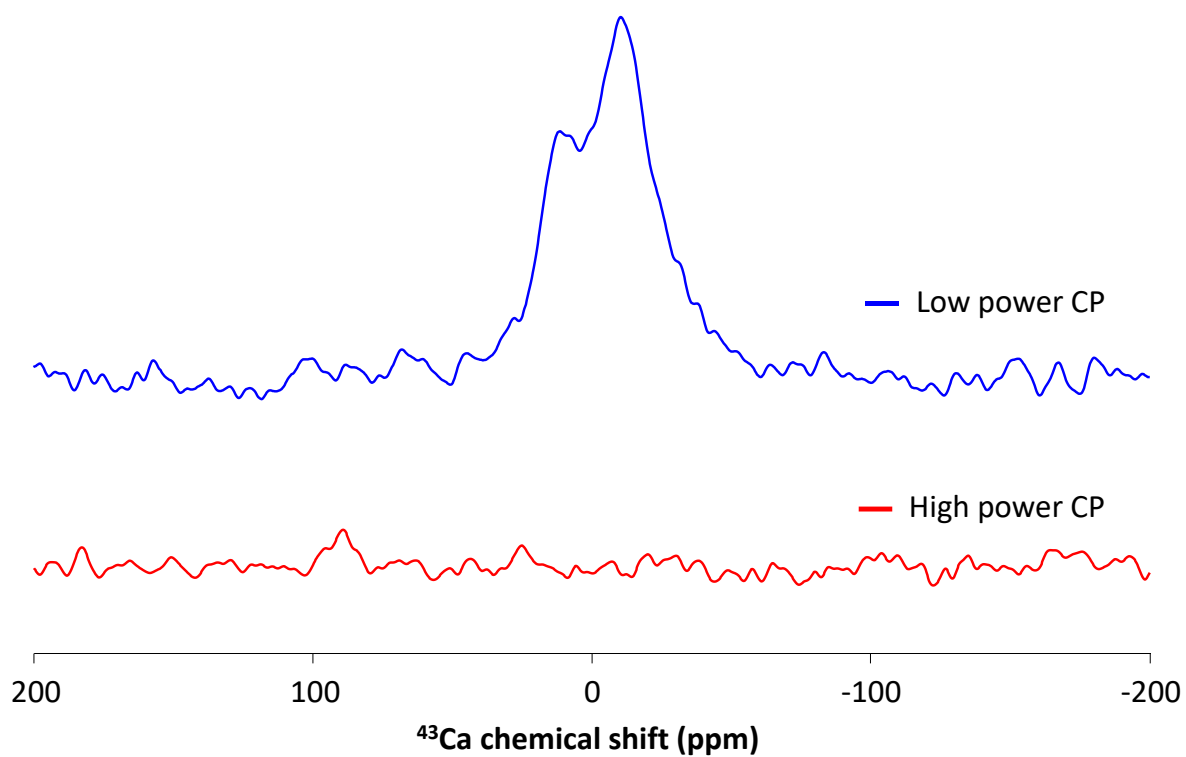


Figure S1. ^{43}Ca DNP MAS NMR normalized spectra of ^{43}Ca -labelled hydroxyapatite sample acquired with HP CP (red) and LP sequences. ^{43}Ca -labelled hydroxyapatite was prepared according to Wang et al.⁴⁵.

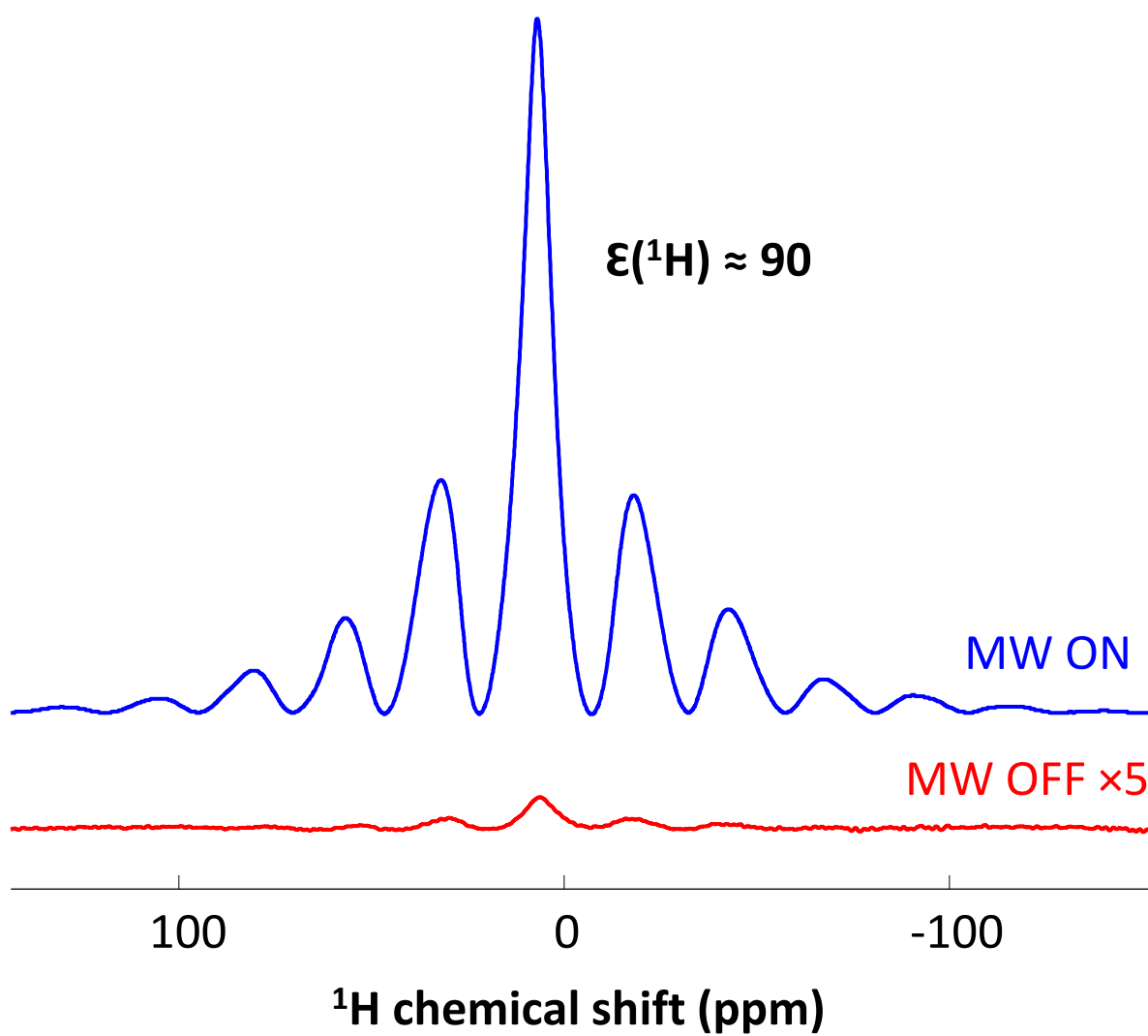


Figure S2. ^1H DNP NMR spectra of Ca- H_2O sample acquired without (red) and with (blue) microwave for ^1H enhancement factor (ϵ) determination.

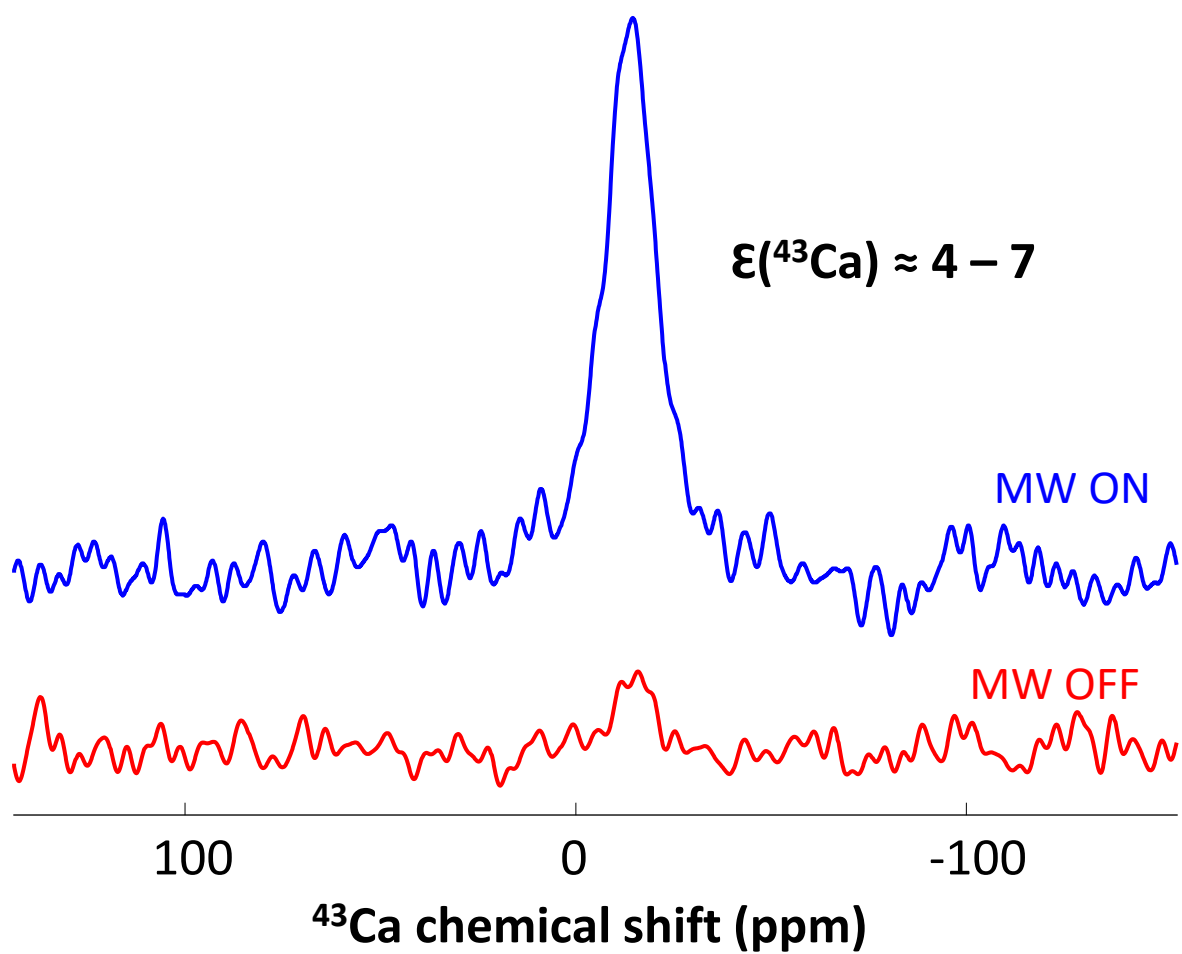


Figure S3. ^{43}Ca enhancement factor calculation for $\text{Ca}_{\text{H}_2\text{O}}$ at 100K. ^{43}Ca spectra were acquired using hyperbolic secant sequence. ϵ was calculated as the ratio of spectra intensities with (blue line) and without (red line) microwave.

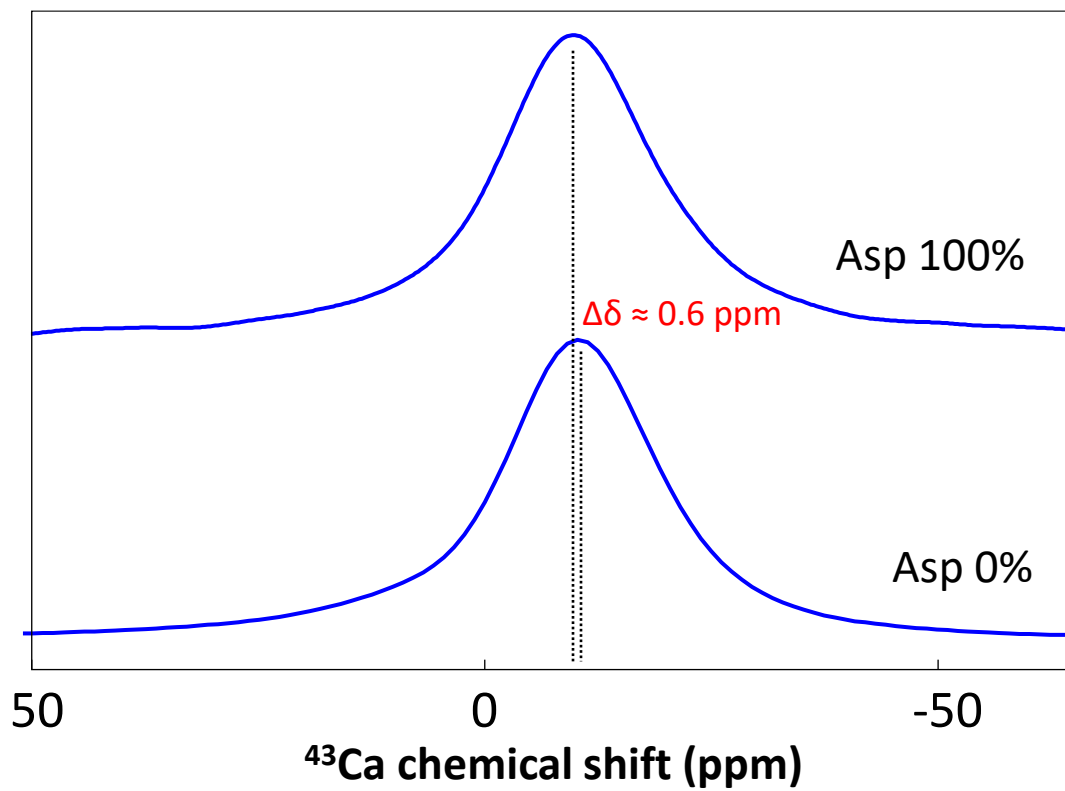


Figure S4. ^{43}Ca CPHP DNP MAS NMR spectra of $\text{Ca}_{\text{Asp}100\%}$ (top) and $\text{Ca}_{\text{H}_2\text{O}}$ (bottom).

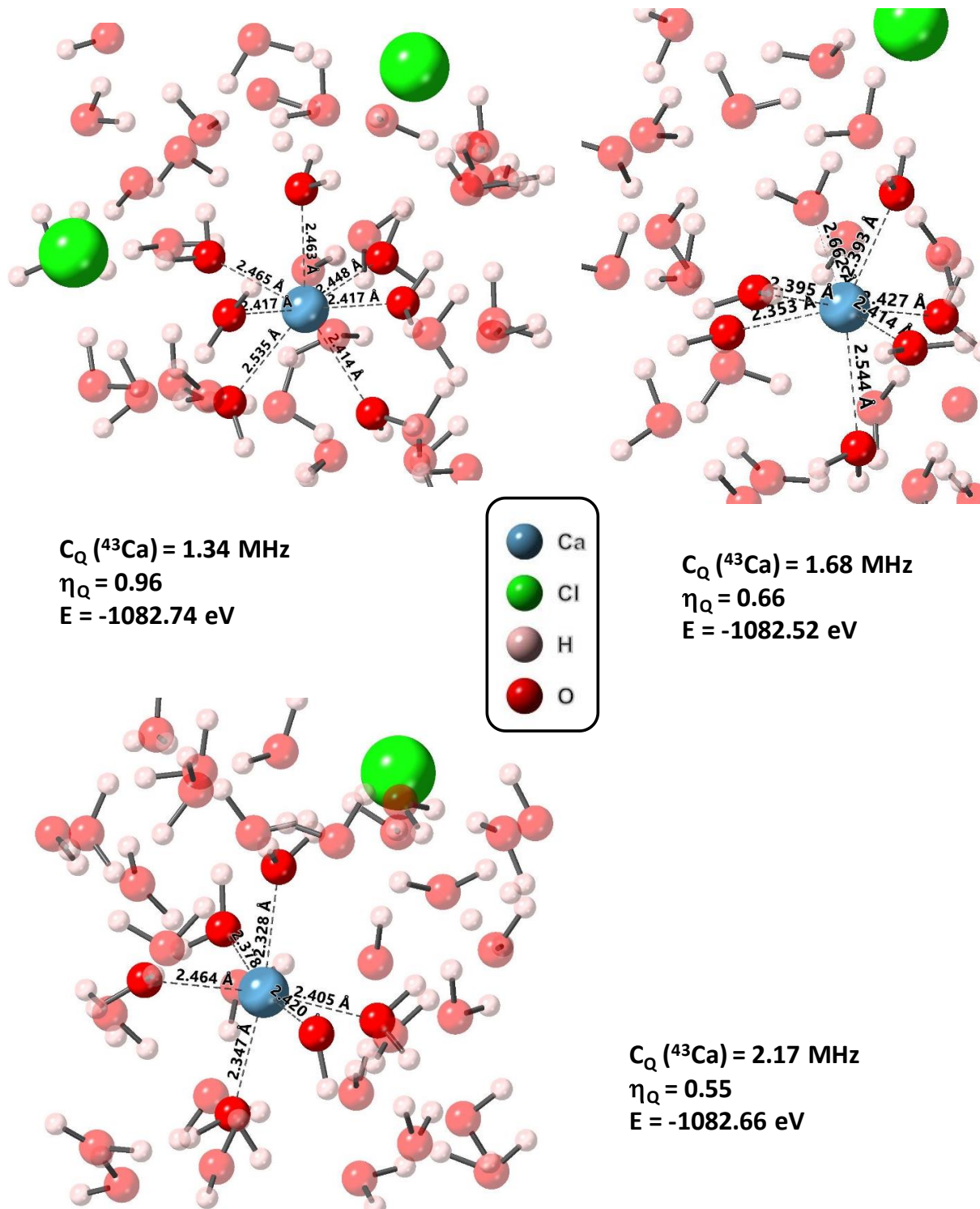
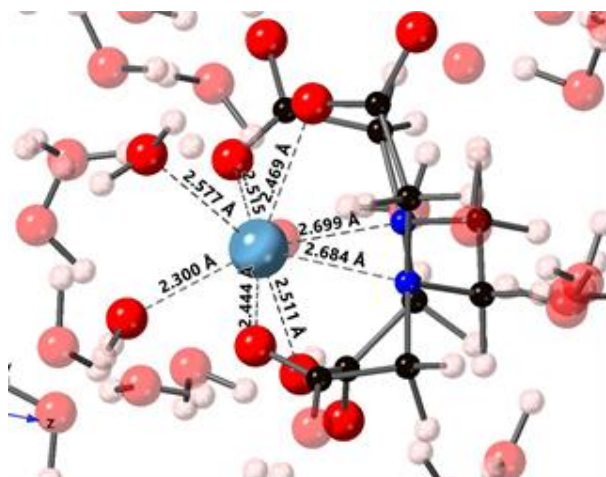
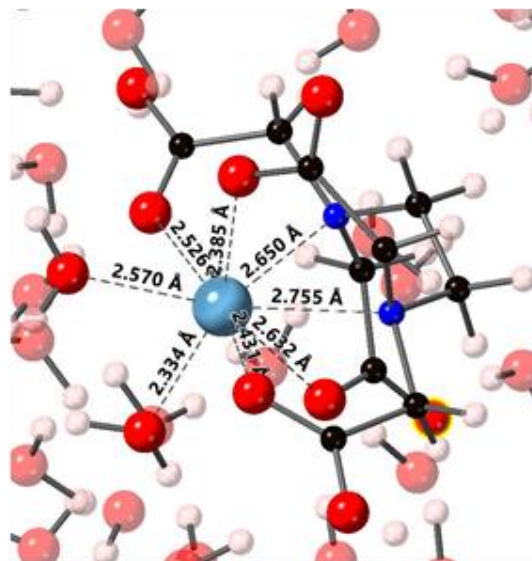


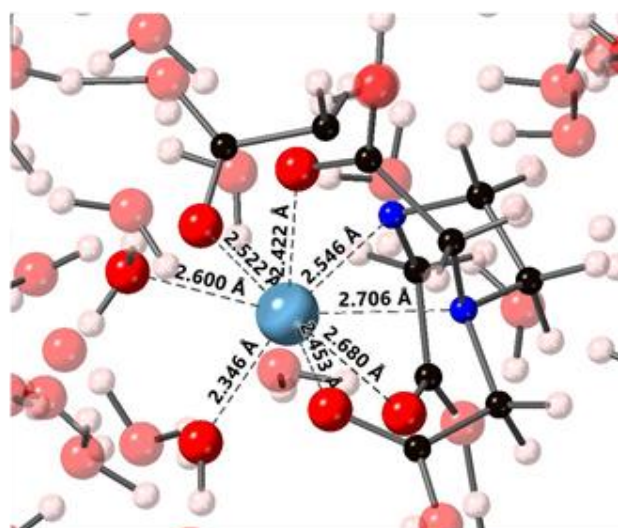
Figure S5. Low energy configurations obtained by DFT and corresponding calculated ^{43}Ca quadrupolar parameters for Ca^{2+} in interaction with water molecules. Characteristic distances around Ca^{2+} are shown.



$C_Q (^{43}\text{Ca}) = 1.30 \text{ MHz}$
 $\eta_Q = 0.53$
 $E = -1003.59 \text{ eV}$



$C_Q (^{43}\text{Ca}) = 1.04 \text{ MHz}$
 $\eta_Q = 0.49$
 $E = -1003.70 \text{ eV}$



$C_Q (^{43}\text{Ca}) = 0.92 \text{ MHz}$
 $\eta_Q = 0.93$
 $E = -1003.95 \text{ eV}$

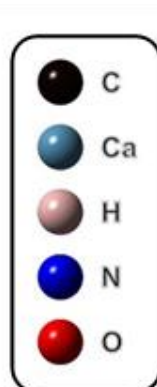
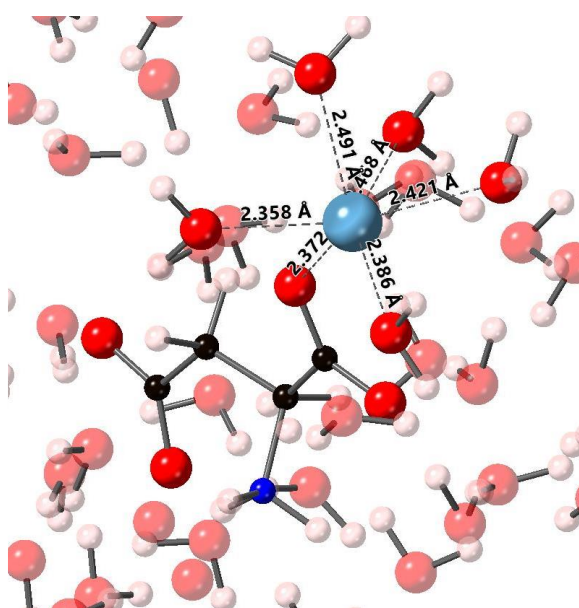
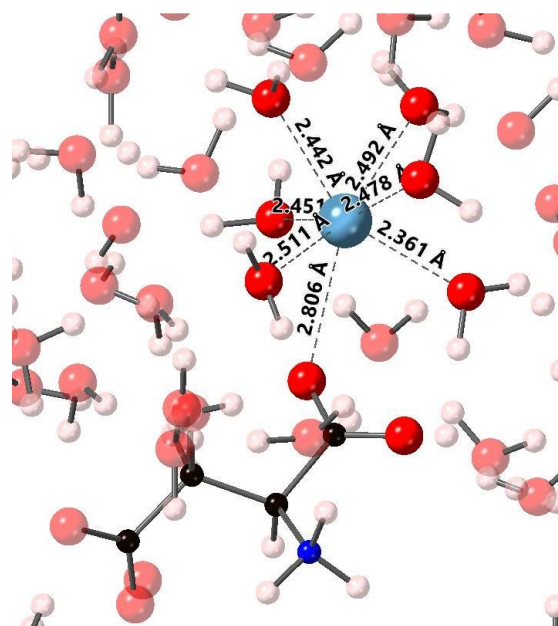


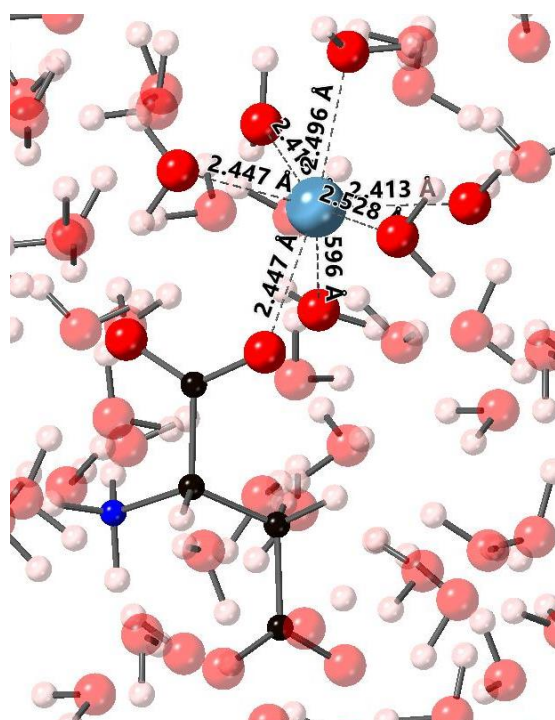
Figure S6. Low energy configurations obtained by DFT and corresponding calculated ^{43}Ca quadrupolar parameters for Ca^{2+} in interaction with EDTA and water molecules. Characteristic distances around Ca^{2+} are shown.



$C_Q(^{43}\text{Ca}) = 2.55 \text{ MHz}$
 $\eta_Q = 0.82$
 $E = -709.38 \text{ eV}$



$C_Q(^{43}\text{Ca}) = 1.37 \text{ MHz}$
 $\eta_Q = 0.51$
 $E = -711.62 \text{ eV}$



$C_Q(^{43}\text{Ca}) = 1.29 \text{ MHz}$
 $\eta_Q = 0.72$
 $E = -711.62 \text{ eV}$

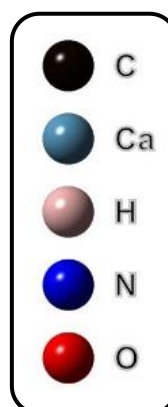
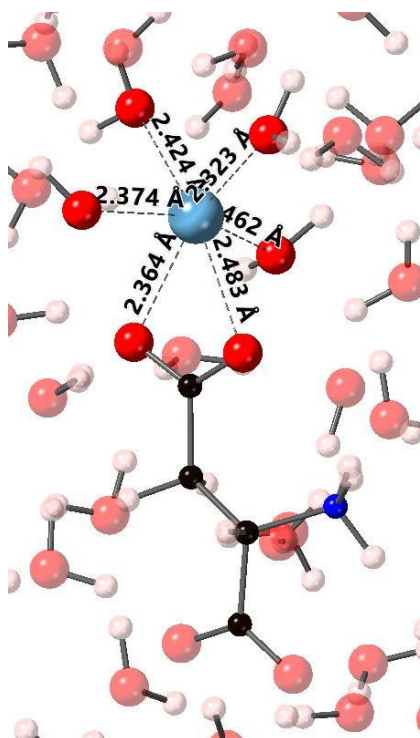
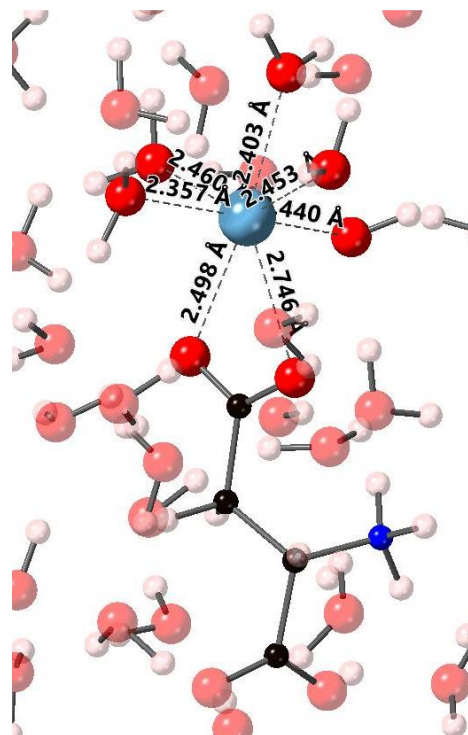


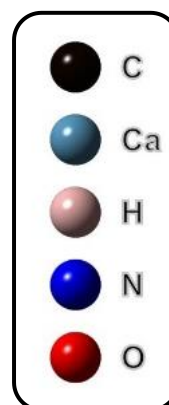
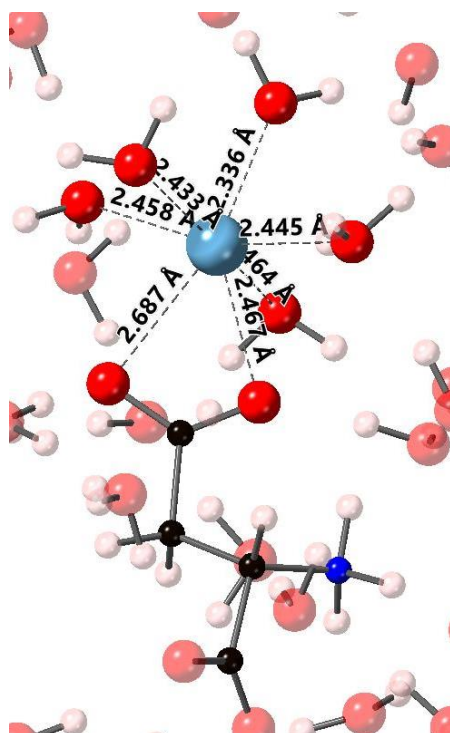
Figure S7. Low energy configurations obtained by DFT and corresponding calculated ^{43}Ca quadrupolar parameters for L-Asp in interaction through C_1OO^- with Ca^{2+} . Characteristic distances around Ca^{2+} are shown.



$C_Q (^{43}\text{Ca}) = 2.42 \text{ MHz}$
 $\eta_Q = 0.33$
 $E = -709.56 \text{ eV}$



$C_Q (^{43}\text{Ca}) = 2.42 \text{ MHz}$
 $\eta_Q = 0.33$
 $E = -709.56 \text{ eV}$



$C_Q (^{43}\text{Ca}) = 1.90 \text{ MHz}$
 $\eta_Q = 0.61$
 $E = -711.86 \text{ eV}$

Figure S8. Low energy configurations obtained by DFT and corresponding calculated ^{43}Ca quadrupolar parameters for L-Asp in interaction through $\text{C}_\alpha\text{OO}^-$ with Ca^{2+} . Characteristic distances around Ca^{2+} are shown.

3) Conclusion de l'article

Dans cet article scientifique, nous proposons une approche permettant d'étudier des solutions vitrifiées de complexes de Ca^{2+} enrichies en ^{43}Ca par RMN DNP MAS du ^{43}Ca . En particulier, nous avons mis en évidence que le ^{43}Ca des complexes en solution se comportait plus ou moins comme un spin $\frac{1}{2}$ lorsque la solution était vitrifiée à 100 K. Cela implique qu'une expérience CP qualifiée de « haute puissance » permet un gain en sensibilité de 100 par rapport à un CP « basse puissance » utilisé typiquement pour les noyaux quadripolaires. L'utilisation de conditions de CP haute puissance permet ainsi d'étudier des solutions enrichies en ^{43}Ca de concentration « physiologique » ($[\text{Ca}^{2+}] \leq 10 \text{ mM}$) en quelques heures ou jours, selon la concentration initiale (typiquement 3 minutes à 4 heures pour un spectre 1D).

Nous expliquons ce résultat par deux observations : (i) l'environnement autour du calcium dans les complexes est de symétrie relativement élevée comme le montre nos études par dynamique moléculaire, et cela pour les trois complexes $\text{Ca-H}_2\text{O}$, Ca-EDTA et Ca-LAsp , ce qui implique un C_Q relativement faible (0,9—1,9 MHz). (ii) Les C_Q calculés restent néanmoins plus élevés que les C_Q déterminés (0,6—1 MHz) à partir du peigne de bandes de rotation des spectre 1D CP MAS du ^{43}Ca des complexes. Il semble donc que même à 100 K, la dynamique résiduelle contribue à moyennner l'interaction quadripolaire. Une explication pourrait provenir du fait que nos simulations numériques montrent que tous les complexes semblent posséder une ou plusieurs molécules d'eau complexées au Ca^{2+} . Cette dynamique résiduelle pourrait s'exprimer sous la forme de mouvements moléculaires (vibration des ligands, échanges chimiques des molécules d'eau...) et moyennnerait l'environnement proche des complexes ce qui diminuerait l'effet des interactions anisotropes (l'interaction quadripolaire dans ce cas) sur le spectre.

La mise en place de cette méthodologie nous permettra d'aller plus loin dans l'analyse structurale d'espèces transitoires contenant du calcium. En particulier, plus loin dans ce chapitre, nous appliquerons notamment cette approche à l'étude des PNC par ^{43}Ca DNP MAS.

IV. Suivi temporel de la précipitation

Avant de procéder à la caractérisation par DNP MAS, il convient de connaître la cinétique d'évolution du système dans les conditions de précipitation choisies. Ainsi, nous avons d'abord suivi la réaction de minéralisation par potentiométrie du calcium et par RMN en solution du ^{31}P de manière à déterminer :

- La cinétique d'évolution.
- La quantité d'ions calcium et phosphates liés.
- Les rapports Ca/P des phases formées.
- L'état de protonation des phosphates liés.

1) Mesures potentiométriques de la précipitation

Comme nous avons pu le constater dans les chapitres III et IV de ce manuscrit, les suivis par potentiométrie du calcium et pH représentent une méthode de choix quant à l'analyse de la cinétique de précipitation de phases de phosphates de calcium. En effet, cette technique analytique renseigne sur les différents événements impliqués dans les processus de nucléation et de cristallisation, ainsi que sur la stabilité des différentes phases impliquées. Ces analyses permettent aussi de remonter aux quantités de calcium et de protons liés aux espèces transitoires.

Le suivi potentiométrique du calcium et pH de la minéralisation de la condition 1 est détaillé sur la Figure 1. On peut visualiser la présence de quatre domaines différents mis en évidence par trois baisses significatives de la concentration en ions calcium et du pH (Figure 1A). Comme au chapitre précédent, la présence de PNC dans le domaine A est attestée par la différence entre la concentration initiale en Ca^{2+} (4,31 mM) et la concentration détectée (3,81 mM avant la précipitation). La présence de ces PNC a été confirmée par des observations en cryo-TEM (Figure 2), dans lesquelles nous détectons des objets de taille nanométrique assemblés en réseaux plus ou moins denses (~1–2 nm). Par la suite, la première diminution brutale de pH et de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ (20 min après mélange) est concomitante avec l'apparition d'un précipité blanc. Cet événement remarquable correspond donc à la nucléation du solide (domaine B). Par la suite, les 2 autres diminutions drastiques de pH et d'ions calcium libres (110 et 200 min après mélange) indiquent l'évolution du précipité vers une forme intermédiaire (domaine C), avant la cristallisation de l'HAP (domaine D).

La concentration en calcium lié est déterminée par différence entre la concentration initiale et la concentration détectée par l'électrode sélective des ions calcium (correspondant à la concentration en ions calcium libre). La Figure 1B montre ainsi les quantités de calcium lié en fonction du temps et en particulier, les différents paliers d'augmentations d'ions calcium liés *i.e.* présents dans les différentes phases formées.

Ainsi, les courbes suggèrent la présence de quatre phases différentes ce qui est cohérent avec les données du chapitre précédent et avec les résultats décrits par Habraken *et al.*¹³. Ces quatre phases correspondraient respectivement aux clusters de prénucléation (domaine A), aux agrégats sphériques d'ACP (domaine B), à la phase transitoire d'OCP déficiente en calcium (domaine C) et l'hydroxyapatite biomimétique (domaine D).

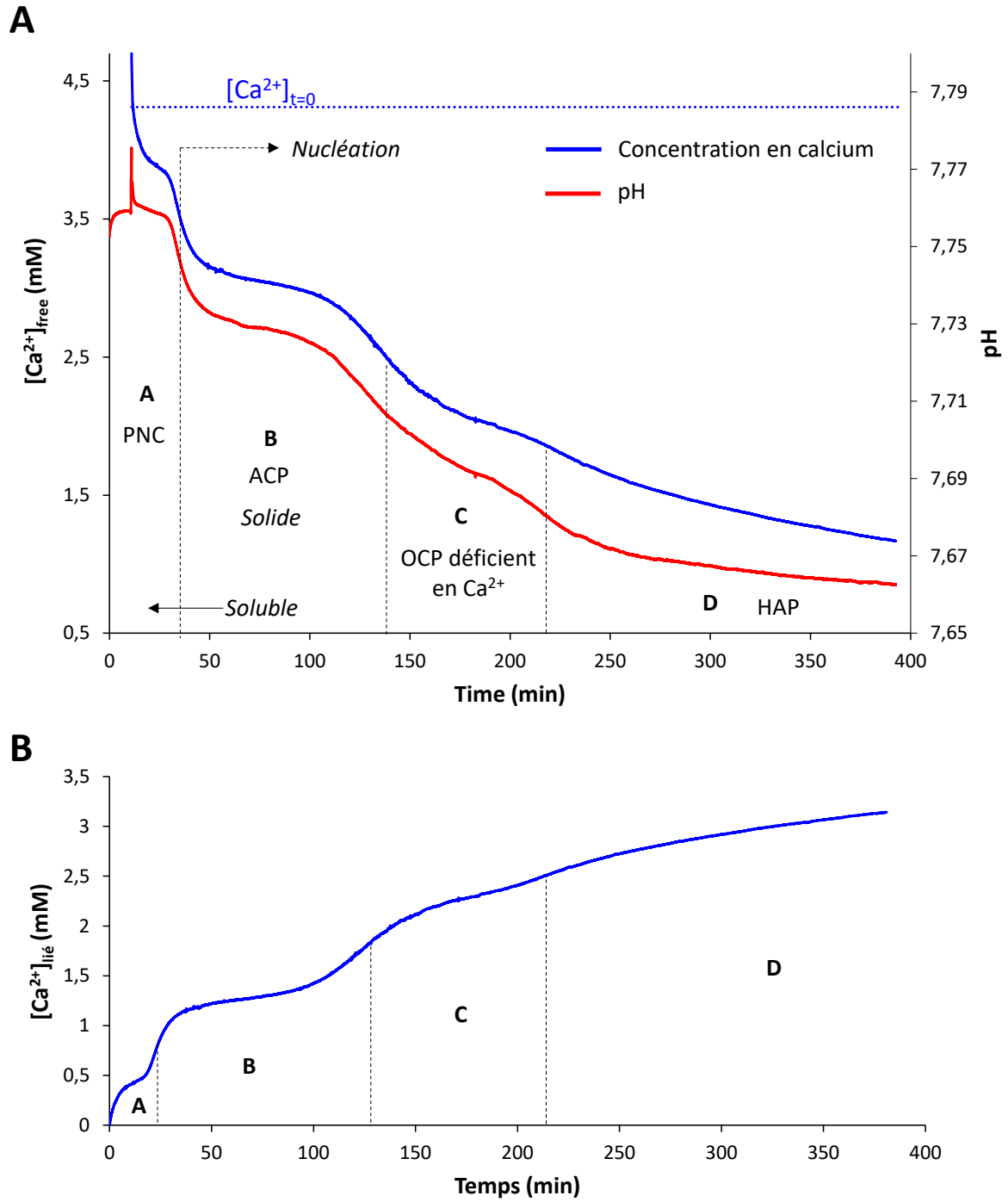


Figure 1 : (A) Suivis potentiométriques de la concentration en calcium libre (bleu) et du pH (rouge) et (B) concentration en calcium lié pour la condition 1 de minéralisation.

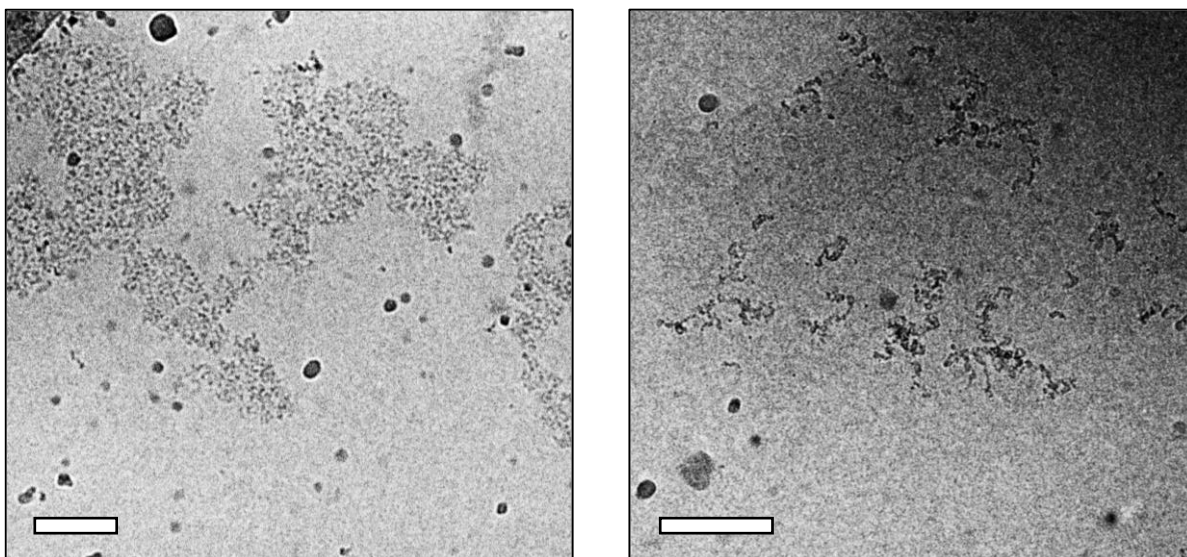


Figure 2 : Clichés cryo-TEM des PNC pour la condition 1 de minéralisation. Vitrification de la solution : 5 min après mélange. Echelle = 100 nm.

2) Suivi spectroscopique par RMN ^{31}P en solution

La potentiométrie ne pouvant apporter d'informations sur le comportement des ions phosphates pendant le processus, nous avons réalisé un suivi quantitatif des ions phosphates en solution par RMN liquide du noyau ^{31}P . Après mesure du temps de relaxation longitudinal T_1 , il est possible de se placer dans des conditions quantitatives. L'expérience a été réalisée en collaboration avec le groupe de Dennis Kurzbach à l'Université de Vienne sur un spectromètre 500 MHz équipé d'une cryosonde s'accordant au ^{31}P . Cette dernière a son stator à température cryogénique ce qui a pour conséquence de grandement réduire le bruit électronique et ainsi d'augmenter nettement la sensibilité ($\times 4$ par rapport à une sonde standard). Ce gain de sensibilité permet *de facto* d'obtenir un rapport signal-sur-bruit satisfaisant en un nombre réduit de scans et par conséquent permet d'augmenter nettement la résolution temporelle de l'analyse de la minéralisation *in situ*. En particulier, nous avons pu analyser la condition 1 en enregistrant un spectre toutes les 5 minutes pendant 12 heures dans des conditions quantitatives.

La Figure 3A présente ainsi l'acquisition de 120 spectres pendant une nuit sous la forme d'une expérience 2D permettant d'observer les variations de déplacement chimique ^{31}P et d'intensité du signal en fonction du temps. En particulier, une brusque variation du déplacement chimique ^{31}P est observée après 40 minutes d'acquisition et correspond à la nucléation. La variation de $\delta^{31}\text{P}$ peut-être due à une brusque variation de la concentration en ions phosphates et du pH accompagnant la nucléation. Par ailleurs, il faut aussi considérer l'échange rapide entre les ions phosphates et les PNC induisant un déplacement chimique moyen plus élevé que celui des phosphates libres²¹. Nous remarquons ici une différence vis-à-vis des expériences potentiométriques concernant la cinétique de nucléation (40 min vs. 20 min) que nous attribuons à l'absence d'agitation dans le spectromètre. Après nucléation, nous considérons que seuls les ions phosphates libres en solution sont détectés car (i) nous n'observons pas de PNC par cryo-TEM après la nucléation et (ii) la brusque variation de déplacement chimique après la nucléation laisse supposer que le régime d'échange rapide $\text{P}_i \leftrightarrow \text{PNC}$ est arrêté et

qu'on observe seulement des ions libres. Ces derniers ont un déplacement chimique qui diminue de manière monotone pendant le reste de l'expérience. Cette faible dérive s'explique très probablement par la diminution du pH précédemment détectée par potentiométrie.

Pour aller plus loin, l'analyse de l'aire sous le signal (intégrale) permet de déterminer la concentration des phosphates en solution. Quelques spectres sont montrés en Figure 3B à titre d'exemple. Cette méthodologie précédemment décrite dans les chapitre III et IV permet de quantifier les phosphates en solution en fonction du temps. Si, avant la nucléation, à la fois les ions libres et les PNC sont détectées (donnant lieu à l'intégrale correspondant à la concentration initiale en phosphates), seuls les ions libres sont détectés après la nucléation (en supposant que les PNC sont en quantité négligeable). En soustrayant simplement la variation de la concentration à la concentration initiale, il est alors possible de déterminer la concentration en phosphates liés dans un solide en fonction du temps. Les résultats sont présentés en Figure 3C. Au début de l'expérience, la grande majorité des phosphates est sous forme soluble. Néanmoins, après environ 45 minutes d'acquisition, on remarque une augmentation brusque de la concentration en phosphate liés sous forme solide de 1,50 mM, ce qui représente 54% de la concentration totale en phosphates. Par la suite, on observe une augmentation lente d'ions phosphates liés dans un solide tendant vers 77% de la concentration totale en phosphates (2,15 mM). Cette expérience démontre que l'apport majoritaire de phosphates dans la phase solide survient majoritairement pendant la nucléation, voire dans la prénucléation comme discuté lors du chapitre précédent en posant l'hypothèse que la quantité de phosphate apparaissant dans la phase nucléée était la même que dans les PNC. En effet, les variations de pH pendant la prénucléation suggèrent que les ions Ca^{2+} se lient avec des phosphates pour former des complexes chargés négativement rendant peu probable l'intégration d'ions phosphates (eux aussi chargés négativement) dans les étapes suivant la prénucléation.

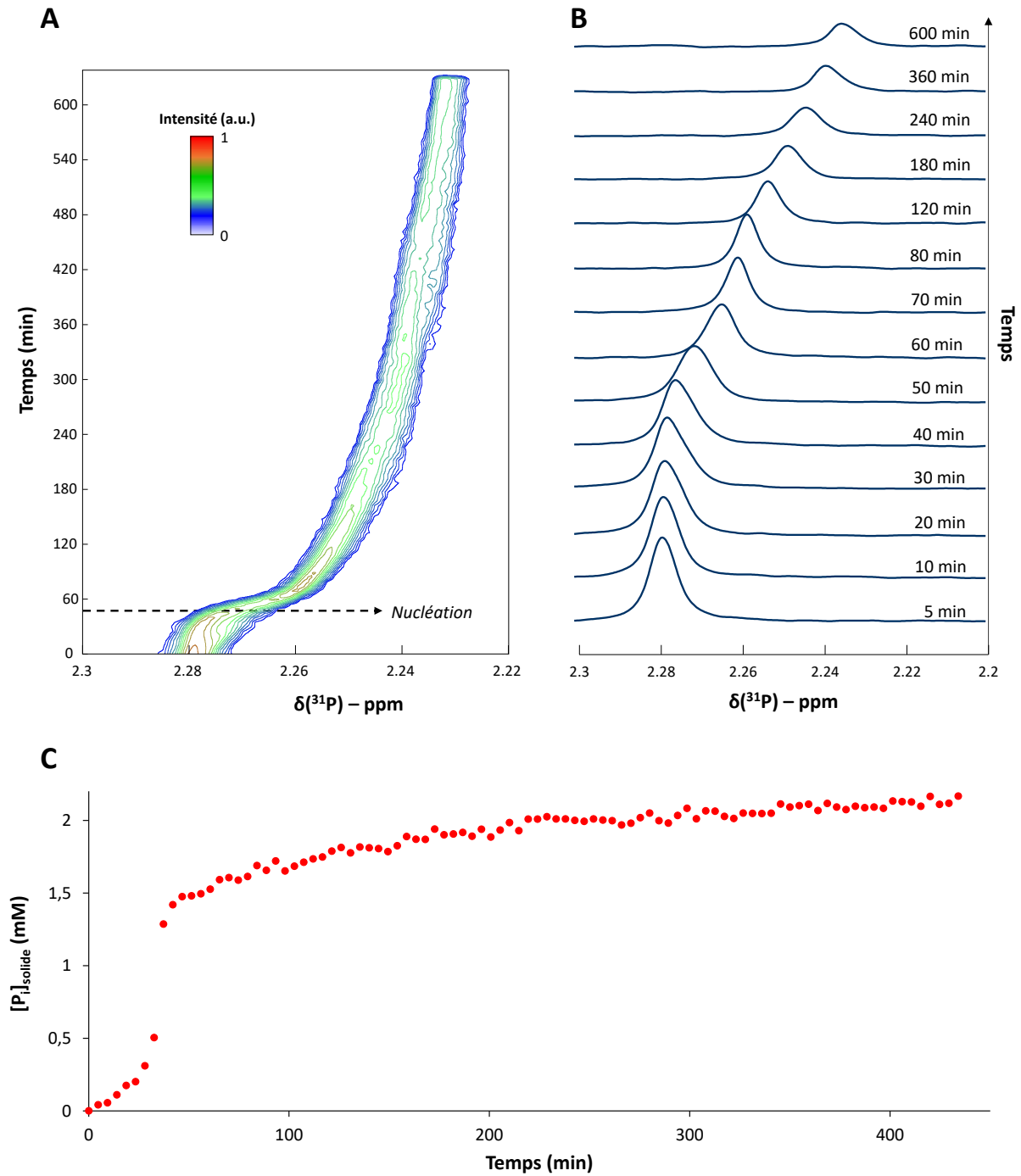


Figure 3. (A) Suivi de la réaction de minéralisation (condition 1) par RMN du ^{31}P en solution en fonction du temps. (B) Extraction de spectres RMN 1D du ^{31}P . (C) Concentration en phosphate liés dans les phases solides au cours du temps.

3) Rapports Ca/P et spéciation des phosphates

L'objectif de ce paragraphe est de déterminer l'évolution du rapport Ca/P des phases formées en fonction du temps.

En combinant les données issues des suivis par potentiométrie et par RMN ^{31}P en solution (Figure 3B et Figure 3C, respectivement), il est possible de déterminer le rapport Ca/P des phases formées en fonction du temps en divisant la concentration en ions calcium liés par la concentration en ions phosphates liés dans les phases solides. Cependant, la RMN ^{31}P en solution ne permet pas de calculer directement la quantité d'ions phosphates liés sous forme de PNC. En utilisant de nouveau l'hypothèse que la quantité d'ions phosphates solubles liés est identique à la quantité d'ions phosphate liés juste après la nucléation, nous avons calculé les premiers points (jusqu'à 45 minutes) en utilisant la valeur fixe de 1,50 mM pour $[\text{P}_i]_{\text{lié}}$ correspondant à la concentration en phosphates liés juste après la nucléation. Les résultats consignés en Figure 4 permettent ainsi de détailler le rapport Ca/P des différentes phases formées au cours du temps par pas de 5 minutes :

- PNC : $\text{Ca/P} \approx 0,33$, en accord avec les résultats exposés dans les chapitres III et IV.
- Clusters de postnucléation : $\text{Ca/P} \approx 0,67$.
- Phase transitoire : $1 \leq \text{Ca/P} \leq 1,33$.
- Hydroxyapatite « biomimétique » : $\text{Ca/P} \approx 1,50-1.55$.

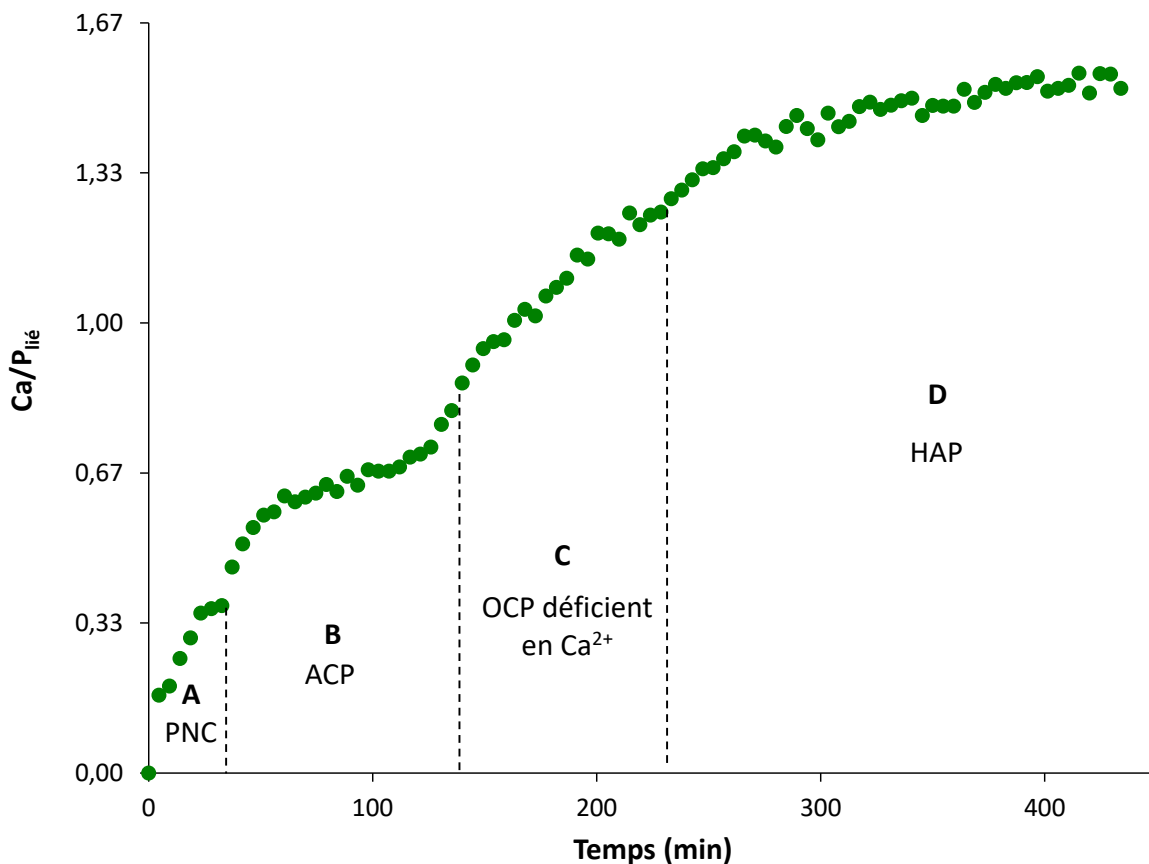


Figure 4 : Evolution du rapport $\text{Ca/P}_{\text{lié}}$ en fonction du temps pour la condition 1 de minéralisation.

Nous trouvons le même profil que déterminé précédemment (chapitre III, Figure 5C de l'article), ce qui signifie que le rapport Ca/P des phases transitoires ne semble pas affecté par les changements des conditions expérimentales étudiées ici. Cela suggère donc que la nature de ces phases sont identiques, en particulier les PNC sont aussi des unités de triphosphates de calcium $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)^{3-}$. Le rapport Ca/P peut être un indicateur très intéressant quant à l'identification de phases de phosphates de calcium, mais qu'il n'est pas forcément suffisant pour discriminer deux phases²². Par exemple, la brushite $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et la monétite CaHPO_4 possèdent le même rapport Ca/P mais une structure et un état d'hydratation différents. Ainsi, le rapport Ca/P sert de complément à l'utilisation d'analyses plus poussées telles que la RMN solide, la diffraction des rayons X, ou encore l'analyse thermogravimétrique (ATG).

Par ailleurs, nous avons souhaité avoir des informations plus poussées sur les variations de pH induites par les changements de phases de manière à évaluer la spéciation moyenne des ions phosphates dans les différentes phases. Comme dans le chapitre précédent (Article III, Figure 8A), une quantité d'acide de concentration donnée a été ajoutée à une solution de référence identique à la condition 1, mais ne contenant pas d'ions calcium, de manière à établir le lien entre la variation de pH et la quantité de protons relargués en milieu tamponné (tampon Tris et présence de phosphates à un pH proche du pK_a). La diminution du pH a ainsi pu être reliée à la quantité de protons provenant de l'acide ajouté, ce qui a permis d'élaborer un modèle en appliquant une régression linéaire des données par un polynôme de degré 2 (Figure 5A). Connaissant les variations du pH (Figure 1A) pendant la minéralisation, nous avons appliqué ce modèle pour calculer la quantité de protons relargués au cours du temps (Figure 5B). Ce dernier corrèle temporellement avec le profil d'intégration d'ions calcium dans la structure. Néanmoins, ses variations sont induites par des changements d'état de protonation dans les ions phosphates liés. Un PNC étant composé de 3 ions phosphates pour un ion calcium, nous pouvons déterminer la quantité de protons relargué par cluster ($\text{H}^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$) (Figure 5C) à partir de la variation de phosphates liés dans les phases solides (Figure 4).

Pendant la prénucléation, nous n'observons pas de variation drastique de la concentration en protons relargués. Cela signifie qu'à pH 7,75, la spéciation des ions phosphates (78% d'ion HPO_4^{2-} , 22% d'ions H_2PO_4^-) permet d'ores et déjà de former des clusters de prénucléation. On en déduit que les espèces de prénucléation contiennent des ions phosphates dont l'état de protonation est proche de la spéciation des ions phosphates en solution à pH 7,75. Ces résultats sont cohérents avec les conclusions tirées dans les chapitres III et IV de ce manuscrit, décrivant les clusters de prénucléation comme des ions de calcium triphosphates ayant la formule $[\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)]^{3-}$ peu importe les conditions initiales de précipitation.

Ce chapitre s'intéressant à la structure des PNC, la suite de l'analyse concernant la spéciation des phosphates dans les espèces transitoires solides sera présentée dans le chapitre VI. Dans les paragraphes suivants, nous étudions la structure des PNC par RMN du solide hyperpolarisée (DNP MAS) sur des solutions vitrifiées contenant des PNC.

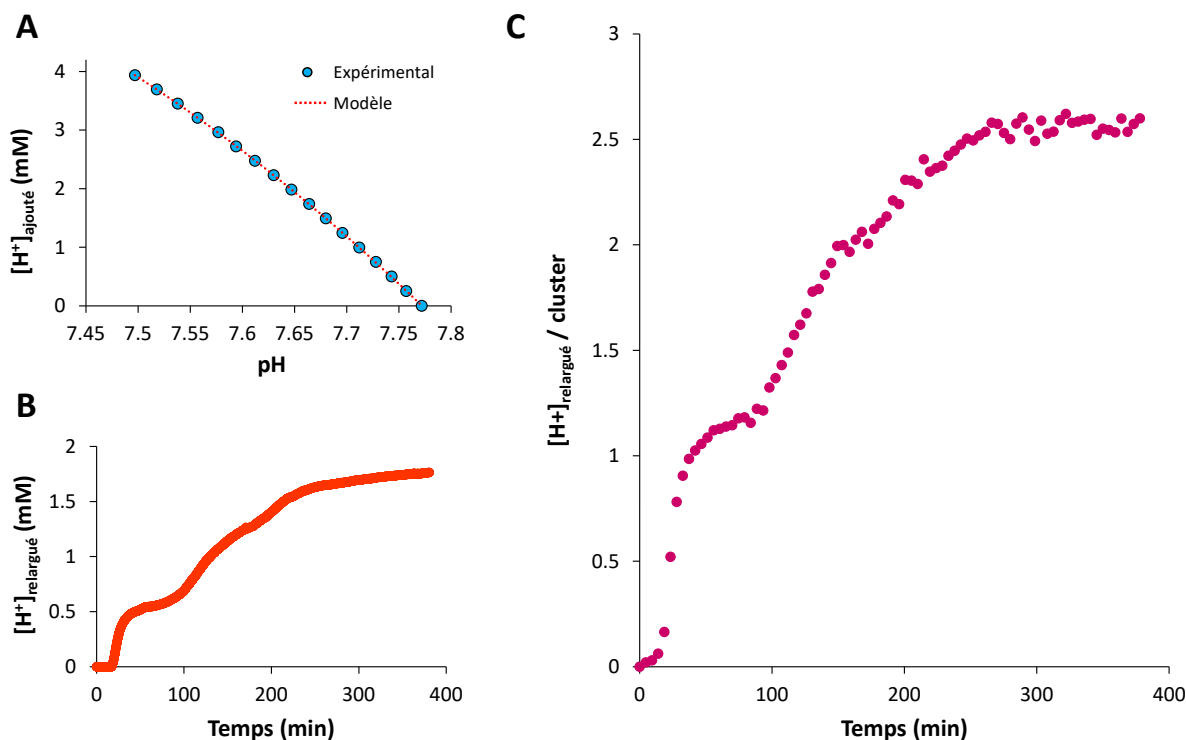


Figure 5 : (A) Modèle polynomiale de l'ajout d'HCl dans une solution similaire à la condition 1 en l'absence d'ions Ca^{2+} . (B) Profil de relargage protonique absolu et (C) par cluster de prénucléation dans la condition de précipitation 1.

V. Caractérisation structurale des PNC par DNP MAS

Les PNC étant des espèces solubles et transitoires, il convient de stopper leur dynamique afin de pouvoir les caractériser plus facilement par RMN à l'état solide²³. De ce fait, nous avons décidé d'analyser des solutions vitrifiées. Par analogie avec le cryo-TEM, méthode d'observation exploitant la même approche, nous présenterons par la suite une analyse structurale par RMN ^{31}P et ^{43}Ca à l'état solide sur des solutions vitrifiées et à température cryogénique (typiquement 100K). Enfin, les concentrations utilisées sont très faibles, de l'ordre du mM, induisant une faible sensibilité. De ce fait, nous utiliserons la polarisation dynamique nucléaire ou DNP de manière à gagner en sensibilité tout en maintenant la solution vitrifiée à 100K.

1) ^{43}Ca DNP MAS : applications aux PNC

Les expériences qui vont suivre ont été réalisées en collaboration l'équipe de Giulia Mollica, directrice de recherche à l'Institut de Chimie Radicalaire à l'Université d'Aix-Marseille pour son expertise en DNP MAS. Les spectres ^{43}Ca DNP MAS ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker 400 MHz en utilisant une sonde LT-MAS de 3,2 mm de diamètre en configuration double $^1H-^{43}Ca$ et étant connecté à un gyrotron à 263 GHz. Ce dernier délivre les micro-ondes nécessaires à l'excitation des radicaux utilisés en DNP. Il convient de préciser que la sonde est thermostatée à 100K grâce à des flux

d'azote gazeux refroidis à l'azote liquide circulant dans cette dernière, notamment pour faire tourner le rotor. L'objectif étant de vitrifier des solutions contenues directement dans le rotor fermé, nous avons dû ajouter un agent cryoprotectant, ici le glycérol. Le risque, lorsque l'on s'en affranchit, est de former de la glace cristalline qui a pour conséquence de reprécipiter les phases dissoutes. En particulier, le radical utilisé peut reprécipiter ce qui a pour conséquence de réduire voire d'annuler le gain de sensibilité attendu, et les nombreux sels dissous pourraient reprécipiter et complètement fausser l'étude. En général, l'utilisation première de la DNP MAS concerne l'étude de surfaces de solides, généralement sous formes de poudres. Dans ce cas, le solide est imprégné d'un mélange optimisé appelé « DNP juice » contenant généralement 60% de glycérol (si possible deutéré), 30% de D₂O et 10% d'H₂O. Comme nous pouvons le constater, il peut être important de diluer le bain de proton de manière à limiter le transfert d'aimantation des électrons polarisés à un bain de proton plus faible, car cela mène généralement à des gains en sensibilité plus importants²⁴. Dans notre cas, nous avons décidé de réduire la proportion de glycérol à 20% de manière à limiter son impact sur la cristallisation et de se placer dans des conditions plus proches de solutions purement aqueuses. Pour les mêmes raisons, nous avons limité l'utilisation de D₂O à environ 30%, les gains de sensibilité étant suffisants dans notre cas. Enfin, le radical utilisé dans notre cas était AMUPol à raison de 15 mM du fait de sa solubilité dans l'eau et de son efficacité en termes de gain en sensibilité. Ce type d'approche, basée sur une réduction de la quantité de glycérol, a déjà été utilisé pour étudier la nucléation et le polymorphisme de la glycine^{23,25}.

L'étude a été réalisée sur la condition de minéralisation 1 (*Tableau 1*) en enrichissant la solution de calcium en ⁴³Ca (62,2%). La solution a été insérée dans un rotor de 3,2 mm après 15 minutes de mélanges de manière se trouver dans le domaine d'existence des PNC (domaine A). Le rotor a ensuite été inséré dans la sonde basse température (100K) de manière à vitrifier la solution et stopper la réactivité. Le gain en sensibilité conféré par la DNP a été estimé à $\epsilon = 110$ par comparaison des spectres ¹H obtenus avec et sans micro-ondes. La meilleure sensibilité a été obtenue en utilisant la condition de CP MAS « haute puissance » qui semble être préférable pour les espèces solubles (*cf.* Figure 1B de l'article ci-dessus). En effet, aucun signal n'a pu être obtenu par CP « basse puissance » ou par excitation directe du noyau ⁴³Ca.

La proportion d'ion calcium liés dans les PNC a été estimée à 12—15% par potentiométrie du calcium après 15 min (Figure 1A). Compte tenu des faibles concentrations en ions calcium, respectivement 0,52 mM et 3,79 mM pour les ions liés et libres, seule l'acquisition d'un spectre 1D CP MAS du noyau ⁴³Ca a été possible en 2,5 jours d'acquisition (Figure 6A). Le spectre présente un maximum à -10,5 ppm et un épaulement à gauche vers 5 ppm. A titre de comparaison, un spectre d'une solution aqueuse de référence de Ca²⁺ (300 mM) a aussi été enregistré (Figure 6B) dans les mêmes conditions et présente une résonance symétrique ($\delta(^{43}\text{Ca}) = -10.5$ ppm, LW = 16 ppm) correspondant à des ions calciums solvatés par des molécules d'eau en bon accord avec les résultats présentés ci-dessus (Figure 1B de l'article). Ainsi, nous attribuons l'épaulement à la contribution des PNC. La déconvolution de ce signal conduit à un maximum à 4,6 ppm et une largeur à mi-hauteur de 20,6 ppm. De manière intéressante et sous réserve d'être quantitatif, l'intégration des 2 signaux permet de déterminer les proportions des 2 espèces à 13% pour le signal des PNC et à 87% pour le signal du Ca²⁺ libre, en bon accord avec les proportions attendues par potentiométrie du calcium.

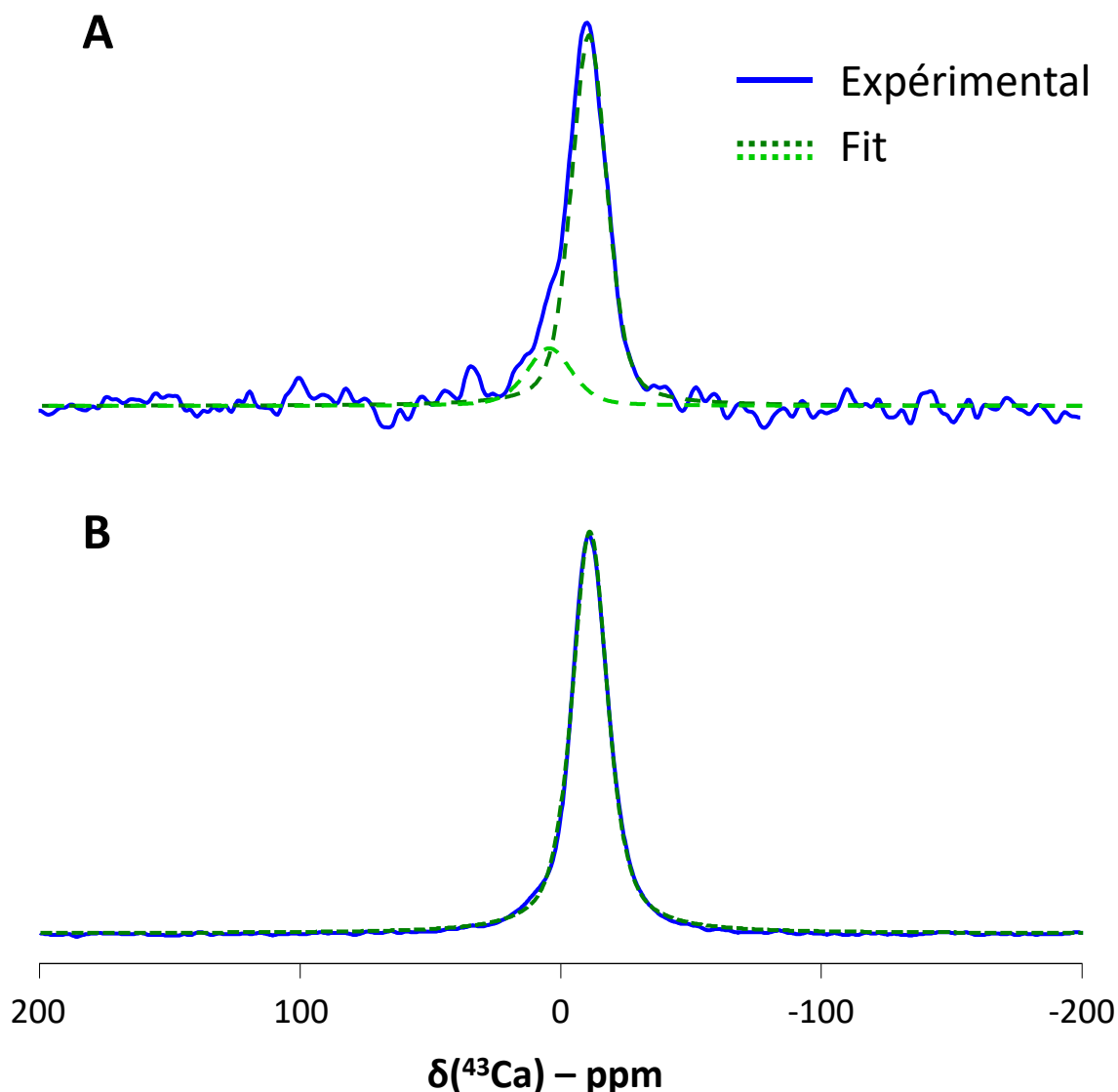


Figure 6 : Spectres ^{43}Ca CP DNP MAS (A) d'une solution vitrifiée contenant des PNC (condition 1 après 5 min de réaction), (B) d'une solution de référence de CaCl_2 (300 mM) à 100K. $\nu_{\text{ROT}} = 8$ kHz. Temps de contact : 3 ms. Les spectres expérimentaux (bleu) ont été ajustés par un modèle gaussien-lorentzien (vert).

La variation des déplacements chimiques ^{43}Ca dans les phases de phosphates de calcium a été corrélée à la variation de paramètres structuraux¹⁷. Par exemple, l'augmentation de $\delta(^{43}\text{Ca})$ comme ici pourrait être induit par une diminution de la coordinence du Ca et/ou des distances Ca—O. Nous n'avons pas été plus loin concernant l'interprétation des résultats, faute de temps. Néanmoins, il serait intéressant de combiner ces résultats avec d'autres expériences permettant de déterminer la coordinence des ions calcium dans les PNC (par exemple par EXAFS), ainsi qu'avec des simulations permettant de déterminer les distances Ca—O impliquées dans les PNC. Nous avons engagé une collaboration avec Christel Gervais (LCMCP, Paris) et l'équipe de Dennis Kurzbach (Université de Vienne) de manière à simuler la stabilité de la structure des PNC et de déterminer ses distances interatomiques.

2) ³¹P DNP MAS

Tout d'abord, nous avons analysé des solutions de référence de phosphates tamponnées à différents pH par RMN ³¹P en solution. Elles étaient typiquement composées de 20 mM d'ions phosphates, 150 mM de KCl et 50 mM de Tris. Elles ont été étudiées à différents pH de manière à caractériser la spéciation des différents phosphates. En effet, le pH auquel nous travaillons se trouve proche d'un pK_a, ce qui signifie que 2 types de phosphates (H₂PO₄⁻ et HPO₄²⁻) sont en coexistence et échangent des protons en permanence. Dans ce cas, l'échange est qualifié de « rapide » ce qui se traduit en RMN ³¹P en solution par l'observation d'un seul signal moyenné en déplacement chimique (Figure 7A, Figure 7B). L'échange peut aussi se refléter dans la largeur de raie (Figure 7C). Dans ces figures, nous retrouvons des valeurs de pK_a proches des pK_a attendus à température ambiante.

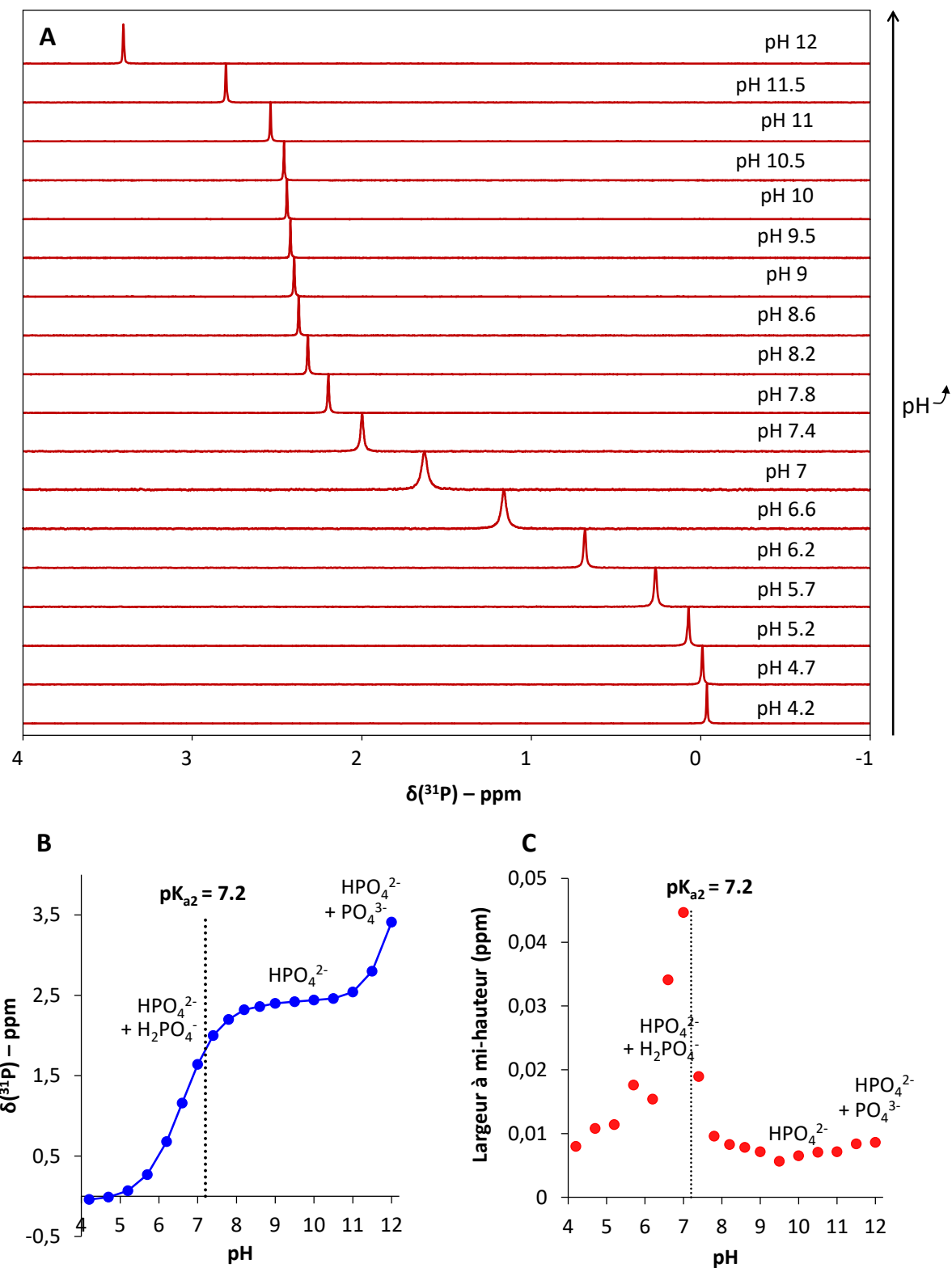


Figure 7 : (A) Spectres ^{31}P en solution de solutions de phosphates (25 mM) à différents pH. (B) Variations du déplacement chimique et (C) de la largeur à mi-hauteur en fonction du pH. Température = 298K.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'étude du noyau ^{31}P par DNP MAS, de manière à collecter des informations sur les ions phosphates impliqués dans les PNC. Les expériences qui vont suivre ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 800 MHz en utilisant une sonde LT-MAS de 3,2 mm de diamètre en configuration double ^1H — ^{31}P et étant connecté à un gyrotron à 527 GHz (125 mA à la réception). Ici, nous avons profité d'un spectromètre haut champ (Réseau Infranalytics, LBM, ENS) de manière à exacerber l'expression spectrale de l'anisotropie de déplacement chimique.

Des solutions de référence analogues ont été analysées par ^{31}P CP MAS DNP à 100K (Figure 8A). L'objectif de cette expérience était d'exploiter l'effet de la basse température pour fortement réduire, voire stopper, les échanges chimiques et la dynamique. Nous avons pris le soin de se placer dans des conditions 100% protonées en utilisant 80% H_2O et 20% de glycérol non deutéré pour étudier la variation du pH sur ces solutions de référence. La première différence notable visible sur les spectres ^{31}P , par rapport à la RMN en solution, est l'apparition d'un peigne de bandes de rotation, caractéristique de l'anisotropie du déplacement chimique, qui indique que les interactions anisotropes ne sont plus totalement moyennées et suggère que les échanges chimiques sont fortement ralentis (Figure 8B). L'allure du peigne de bandes de rotation dépend largement du pH des solutions. Cela nous rappelle que l'anisotropie de déplacement chimique (Δ_{CSA}) varie drastiquement selon l'état de protonation de sels de phosphates, et donc selon leur symétrie²⁶. En particulier, les sels de H_2PO_4^- présentent un Δ_{CSA} négatif élevé, les sels de HPO_4^{2-} ont un Δ_{CSA} relativement élevé positif et les sels de PO_4^{3-} ont un Δ_{CSA} quasiment nul.

De plus, nous constatons que la spéciation des ions phosphates varie fortement en fonction de la température. En particulier, il semble que les formes pures des ions H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} étaient obtenues à pH 4 et 7 à 100K (Figure 8B), respectivement, (contre 4,7 et 9,8, respectivement, à température ambiante). La décomposition des spectres à l'aide d'un modèle de type CSA²⁷ conduit aux paramètres regroupés dans le *Tableau 2* en accord avec la littérature²⁶. La signature spectrale de l'ion PO_4^{3-} pur n'a pas pu être observée directement dans la gamme de pH étudiée (jusqu'à pH 9), des ions HPO_4^{2-} étant aussi observés sous formes de traces. Néanmoins, nous avons pu la déterminer en soustrayant la contribution des ions HPO_4^{2-} , issue du spectre à pH 9 (Figure 8B). Le $\Delta_{\text{CSA}}(^{31}\text{P})$ déterminé des ions PO_4^{3-} est faible, ce qui est aussi en accord avec la littérature.

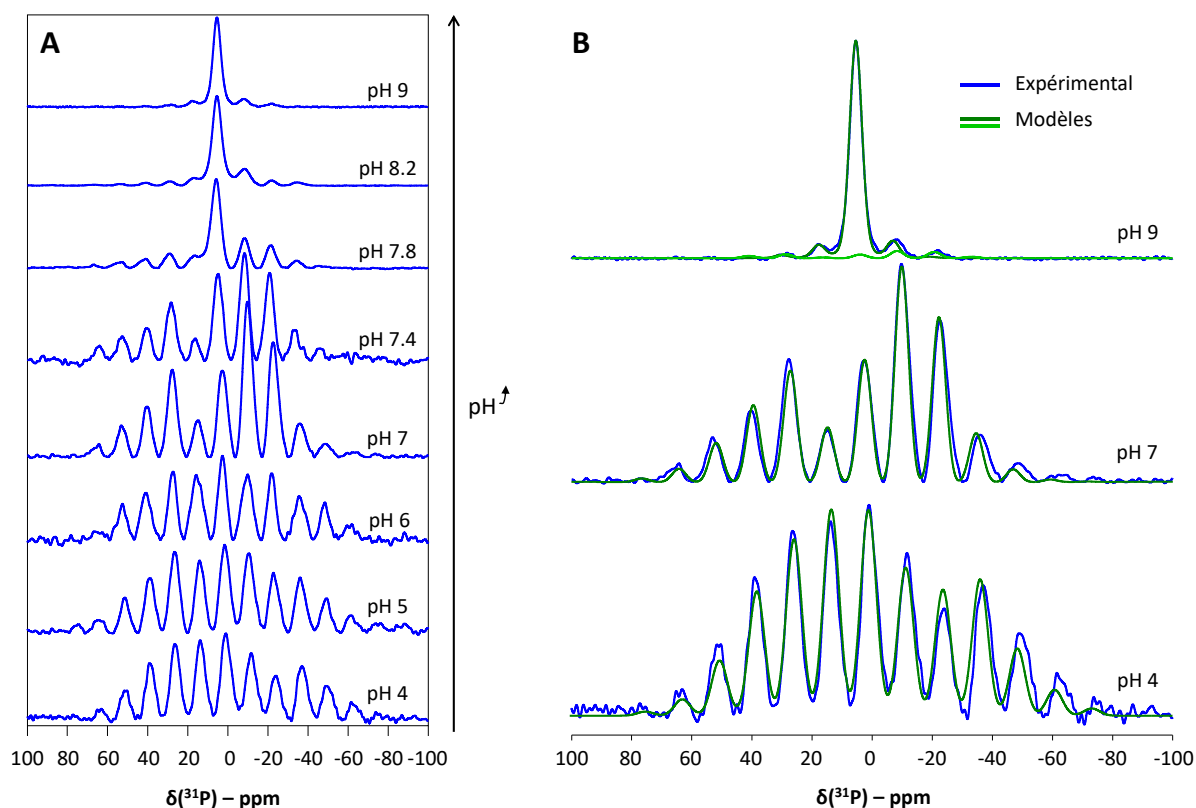


Figure 8 : (A) Spectres ^{31}P CP MAS de solutions vitrifiées de sels de phosphates à différents pH obtenus par RMN DNP. (B) Décomposition des spectres à pH 9, 7 et 4. Température = 100K. $v_{\text{ROT}} = 4$ kHz.

Pour toutes les conditions de pH étudiées à 100K, nous avons déterminé la spéciation des ions phosphates en « fittant » par combinaison linéaire les paramètres CSA (^{31}P) des formes ioniques pures précédemment déterminées. Les proportions relatives sont déterminées par intégration des deux peignes de bandes de rotation correspondants. Les résultats sont présentés en Figure 9B. On constate que la basse température (100K) a tendance à décaler les pK_a vers des valeurs plus faibles, à 6,16 ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) et 7,8 ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$) contre 7,2 et 12,4 à 25°C (Figure 9A). Les résultats à venir sont donc basés sur une observation de la spéciation des ions phosphates à 100K puis retranscrites à température ambiante à partir de la Figure 9. Par exemple, si nous détectons 100% d'ions HPO_4^{2-} à pH 7 et à 100K, cela correspondrait à une spéciation approximative de 39% d'ions HPO_4^{2-} et de 61% d'ions H_2PO_4^- à température ambiante.

Ion	δ_{iso} (ppm)	Largeur à mi-hauteur (ppm)	Δ_{CSA} (ppm)	η_{CSA}
H_2PO_4^-	$1,7 \pm 0,2$	$6 \pm 0,5$	-65 ± 5	$0,76 \pm 0,05$
HPO_4^{2-}	$3,2 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,5$	55 ± 5	$0,35 \pm 0,05$
PO_4^{3-}	$5,3 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,5$	20 ± 5	0

Tableau 2. Paramètres spectroscopiques déterminés pour les différents états de protonation dans les ions phosphates à 100K.

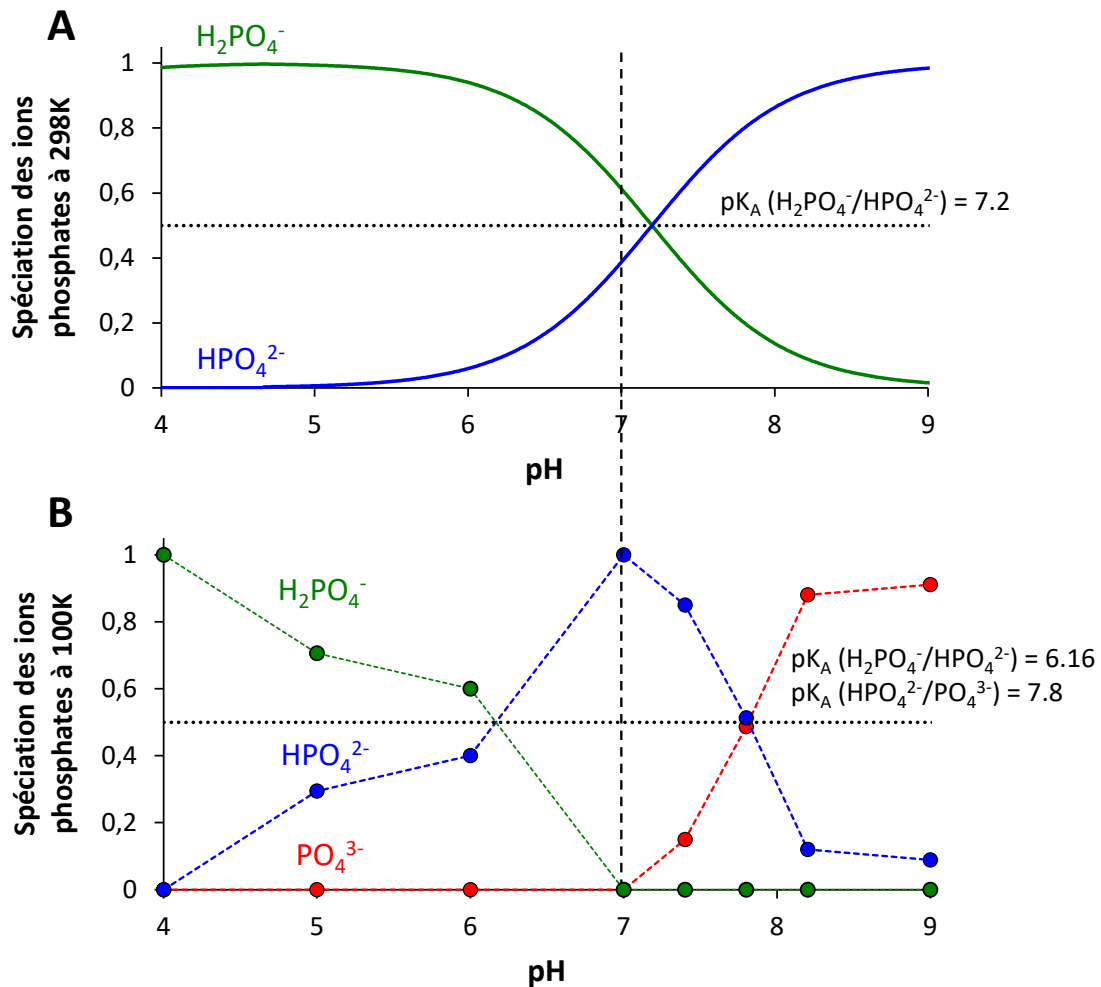


Figure 9 : (A) Spéciation théorique des ions phosphates en fonction du pH à 25°C. (B) Spéciation expérimentale des ions phosphates en fonction du pH à 100K.

Enfin, nous remarquons que le déplacement chimique isotrope qui varie en fonction du pH (Figure 10A et 10B). Cette grandeur pourrait être un autre indicateur de la spéciation. Les signaux sont relativement larges, compris entre 4,7 et 6,1 ppm de largeur à mi-hauteur (Figure 10C). Cette largeur nous renseigne sur une distribution de déplacements chimiques, ce qui est en accord avec une vitrification efficace de la solution, malgré la quantité réduite de glycérol utilisée. Nous notons une asymétrie de certains signaux, ce qui semble indiquer que les échanges chimiques sont bien stoppés. Néanmoins, les signaux sont si larges, par rapport à la gamme réduite de déplacements chimiques qu'il est très difficile de distinguer 2 contributions qui se superposeraient.

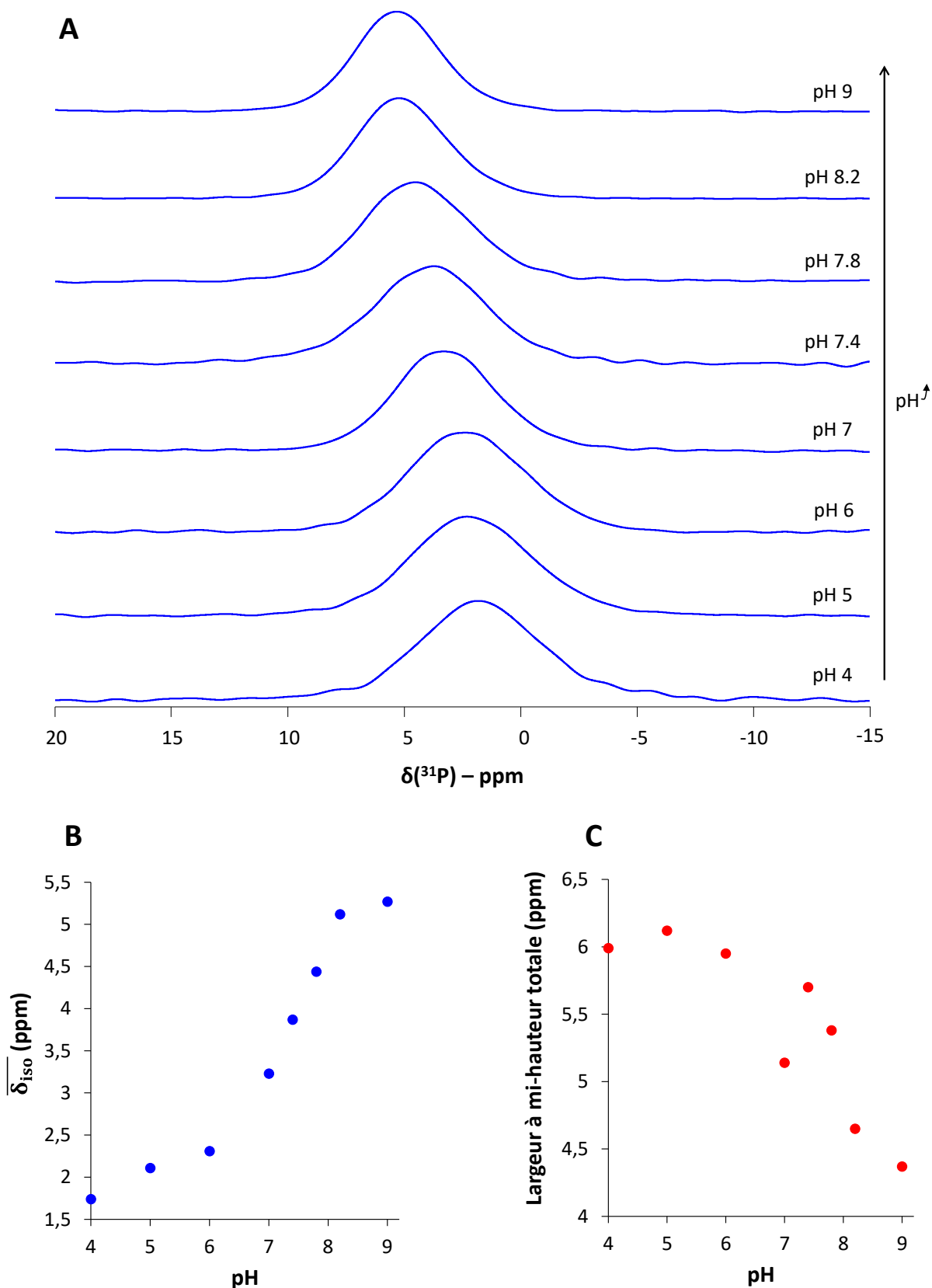


Figure 10 : (A) Zoom sur la résonance isotrope des spectres ^{31}P CP MAS de solutions vitrifiées des ions phosphates à différents pH obtenus par RMN DNP. (B) Déplacement chimique moyen et (C) largeur à mi-hauteur totale en fonction du pH. Température = 100K. $v_{\text{ROT}} = 5$ kHz. Temps de contact = 1 ms.

Pour cette session d'expériences, nous avons utilisé la condition de précipitation utilisée par Habraken *et al.*¹³, appelée condition Habraken dans le *Tableau 1*. Celle-ci présente une cinétique de précipitation similaire à la condition 1 pour un pH initial de 7,4 et un taux de phosphate lié après précipitation estimé à 73% par RMN ³¹P en solution. Les concentrations initiales sont plus élevées que la condition 1 permettant de bénéficier d'un gain en sensibilité plus conséquent. De plus, nos conclusions pourraient être comparées à leurs résultats. Par manque de temps et de disponibilités de la DNP MAS, nous n'avons pas pu réaliser les expériences sur la condition 1 discutée jusqu'à présent dans ce chapitre.

La Figure 11A présente le spectre ³¹P de la solution vitrifiée 12 minutes après mélange. Elle contient ~73% d'ions phosphates liés dans les PNC. La comparaison avec le spectre d'une solution vitrifiée d'ions phosphates à pH 7,4 (Figure 11B) montre que le spectre contenant les PNC présente une raie isotrope plus intense alors que le peigne de bande de rotation semble similaire. Après normalisation par rapport aux bandes de rotations, la différence entre les deux spectres (Figure 12A), présente une résonance unique centrée à 4,9 ppm (contre 3,9 ppm pour des ions phosphates à pH 7,4), soit à un déplacement chimique correspondant à une déprotonation plus marquée des ions phosphates à 100K. Ce déplacement chimique correspondrait à une spéciation correspondant au pH 8 à 100K (Figure 10B). Le faible rapport signal-sur-bruit ne permet pas d'être quantitatif pour raisonner sur le peigne de bandes de rotation. Toutefois, la faible intensité de ses bandes de rotations, suggère que cette dernière a un Δ_{CSA} faible, proche de celui observé en Figure 8A à pH 8,2. Ainsi, cela correspondrait à une spéciation de 13% d'ions $H_2PO_4^-$ et 87% d'ions HPO_4^{2-} à température ambiante. Cela suggérerait alors que les espèces de prénucléation sont des ions calcium triphosphates ayant la formule chimique $[Ca(HPO_4)_{2,61}(H_2PO_4)_{0,39}]^{3,61-}$. Néanmoins, cette différence de spectres ne prend pas en compte la proportion d'ions libres. Ainsi, l'intégrale de ce signal (9% du signal total) ne permettrait pas de justifier le rapport Ca/P (0,33) déterminé précédemment. En effet, Habraken *et al.* estiment la proportion d'ions phosphates liés à 50—61% dans ces conditions¹³. Ce cas de figure est donc peu probable, car les proportions P_i/PNC attendues ne correspondent pas.

D'autre part, si nous réalisons la même différence de spectres en prenant en compte la proportion des ions libres attendue, *i.e.* en retirant la contribution de 40% des ions phosphates libres à pH 7,4 (Figure 12B), nous obtenons le spectre présenté en Figure 12B. Celui-ci peut être ajusté par un modèle prenant en compte les paramètres CSA des ions HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} . Les intégrales de ces contributions respectives sont de 78 et 22% à 100K. Cela correspondrait à un pH de 7,5, ce qui se traduirait par une spéciation de 67% d'ions HPO_4^{2-} et de 33% d'ions $H_2PO_4^-$ à température ambiante, ce qui conduit à la spéciation suivante pour les PNC : $[Ca(HPO_4)_2(H_2PO_4)]^{3-}$, en très bon accord avec les calculs issus de la potentiométrie du calcium et pH.

Il est donc clair que les PNC sont des triphosphate de calcium dans lesquels la spéciation des phosphate est proche de $[Ca(HPO_4)_2(H_2PO_4)]^{3-}$. Néanmoins, l'analyse précédente est basée sur le fait que les ions phosphates libres et dans les PNC ont les mêmes paramètres CSA. Ceux-ci semblant définis par le pH plutôt que par la complexation avec le calcium, chose que nous ne nous expliquons pas pour le moment.

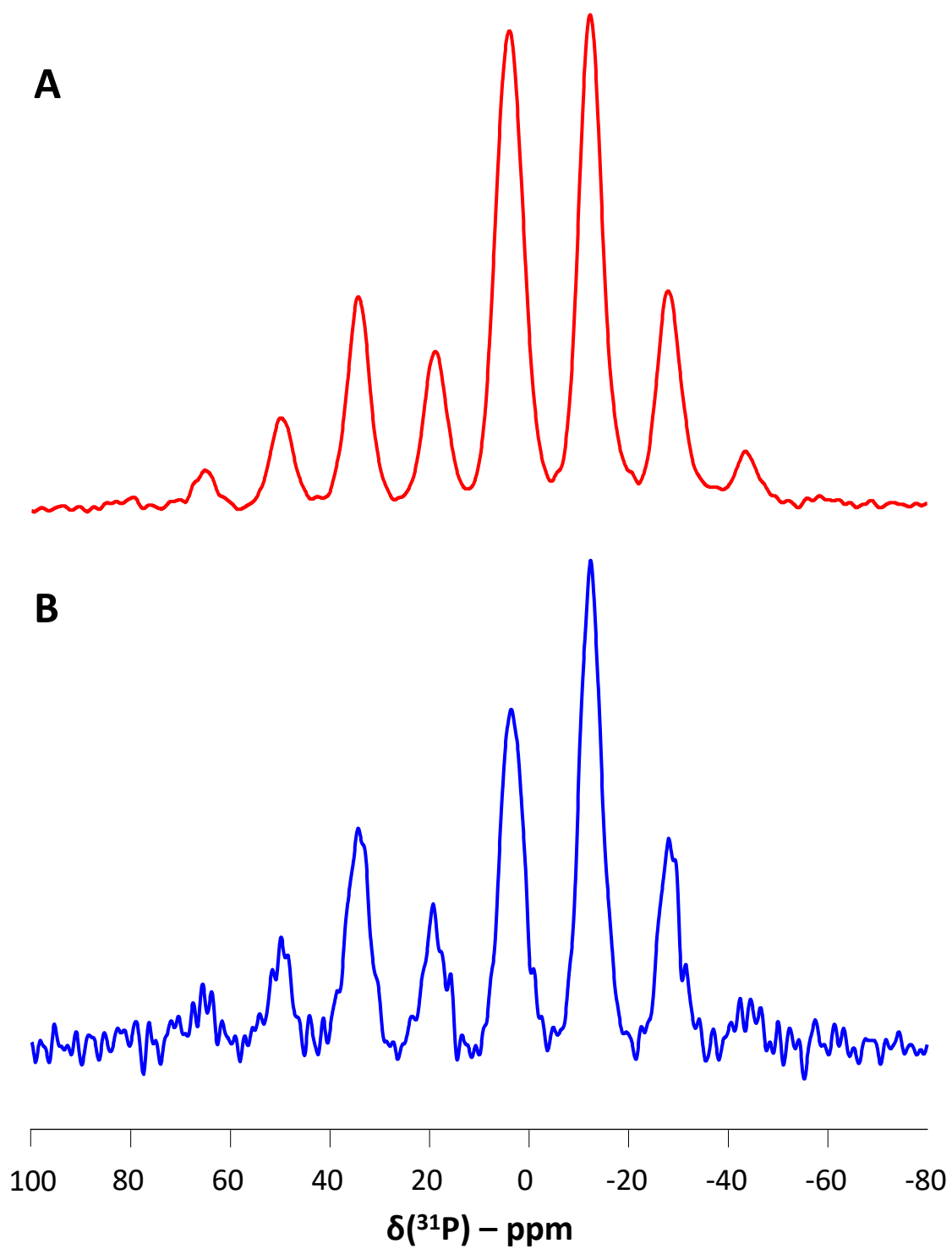


Figure 11 : (A) Spectres ^{31}P CP-MAS d'une solution de phosphates de calcium à pH 7,4 vitrifiée et contenant 73% de phosphates liés sous forme de PNC et (B) d'une solution de phosphates pure à pH 7,4. Température = 100K. $\nu_{\text{ROT}} = 5$ kHz. Temps de contact = 1 ms.

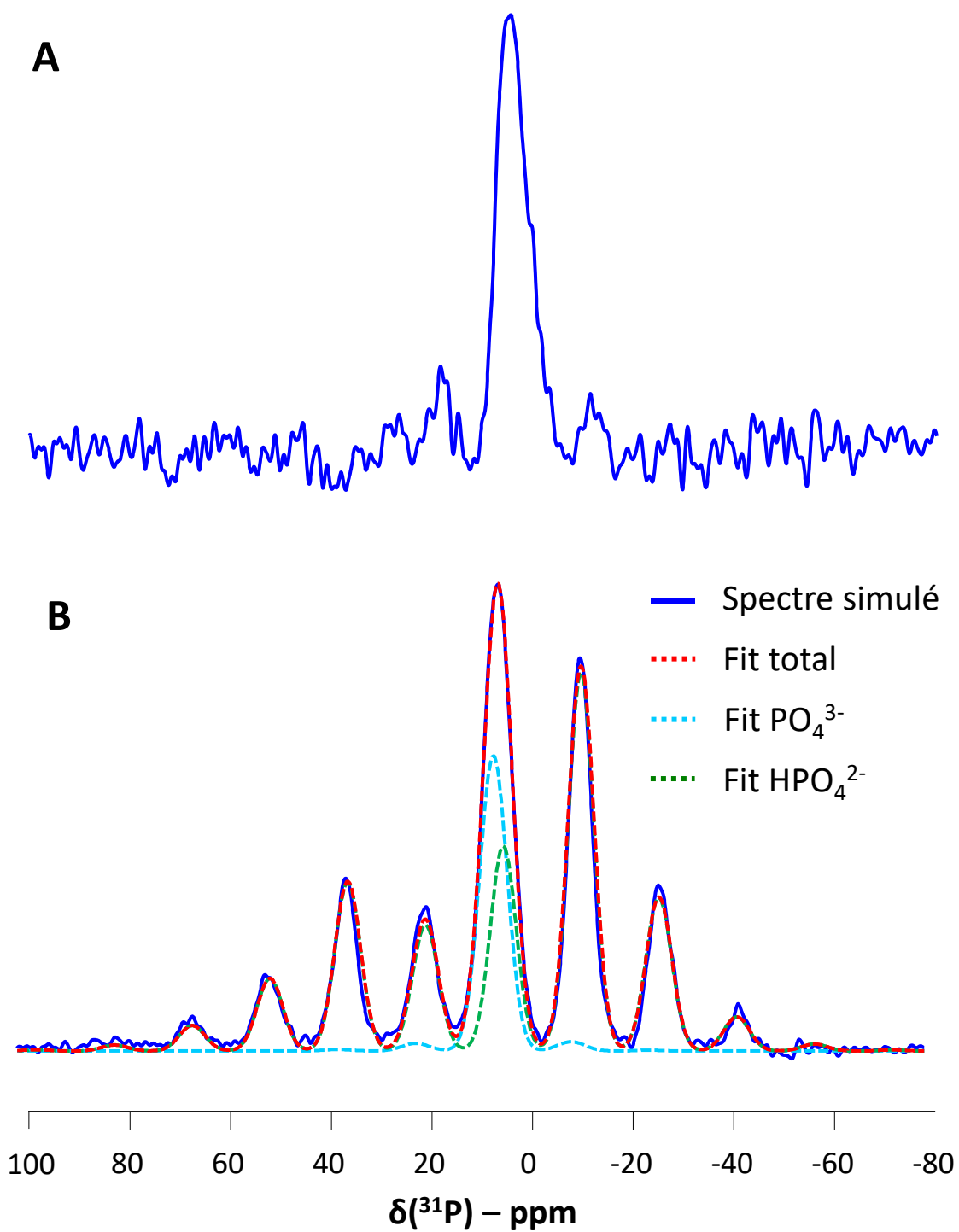


Figure 12 : Différences des spectres contenant les PNC avec la solution de phosphates pure à pH 7,4 (A) basée sur l'intensité des bandes de rotation et (B) prenant en compte 40% d'ions libres. Température = 100K. $v_{\text{ROT}} = 5 \text{ kHz}$. Temps de contact = 1 ms.

VI. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé les clusters de prénucléation intervenant dans le mécanisme non-classique de la nucléation de l'hydroxyapatite en conditions de concentrations et de pH proches des systèmes biologiques. Par analogie avec le cryo-TEM, nous avons pu étudier la structure des espèces de prénucléation en conditions vitrifiées, de manière à réduire leur dynamique pour les « observer » spectroscopiquement par RMN DNP MAS des noyaux ^{31}P et ^{43}Ca .

Premièrement, nous avons optimisé les conditions de minéralisation de manière à obtenir une cinétique de précipitation relativement rapide (≤ 30 minutes) tout en maximisant, d'une part (condition 1) les quantités relatives d'ions calcium liés, et, d'autre part, les quantités relatives d'ions phosphate liés (condition Habraken). La cinétique d'évolution de la condition 1 a été caractérisée par potentiométrie et par RMN ^{31}P en solution. Cela nous a permis de quantifier :

- Les temps caractéristiques d'observation des différentes phases transitoires pures ;
- Les quantités d'ions phosphates et calcium liés ;
- Le rapport Ca/P des PNC ;
- L'état de protonation des PNC.

Connaissant la cinétique d'évolution du système, nous avons vitrifié une solution enrichie en ^{43}Ca (condition 1) que nous avons caractérisée par RMN DNP MAS du noyau ^{43}Ca pendant la phase de prénucléation. Cela nous a permis de détecter ces espèces de prénucléation, en coexistence avec les ions calcium libres, à un déplacement chimique qui semble plus élevé que ces derniers. L'information que l'on peut en tirer est qualitativement liée à une coordinence et/ou à des liaisons Ca—O plus faibles pour les liaisons Ca—O—P que dans les liaisons Ca—O—HO impliquées dans les complexes aqueux. En particulier, des calculs *ab initio* ont permis d'estimer la coordinence de ces derniers à 7 molécules d'eau donnant lieu à des complexes de formule $\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_7^{2+}$ ²⁸. La combinaison avec des simulations moléculaires pourrait permettre d'aller plus loin dans l'analyse de ces différences structurales. Par manque de temps, cela n'a pas été possible, néanmoins notre méthodologie ouvre des perspectives d'amélioration concernant la caractérisation de ce type de systèmes.

Par ailleurs, nous avons réalisé une étude similaire par RMN DNP MAS du noyau ^{31}P sur la condition Habraken suivant un mécanisme de précipitation similaire¹³. En particulier, nous avons notifié et exploité la dépendance de l'état de protonation des ions phosphates aux paramètres d'anisotropie de déplacement chimique. Pour ce faire, nous avons remarqué que les pK_a des ions phosphates variaient fortement avec la température de travail. Plus précisément, les pK_a sont déplacés à des valeurs plus faibles à basse température (ici 100K). En reliant les paramètres CSA à la spéciation des phosphates à basse température, nous avons élaboré un modèle permettant de déterminer la spéciation des phosphates à température ambiante. Ce faisant, nous avons analysé une solution contenant des PNC et estimé leur état de protonation moyen à 67% d'ions HPO_4^{2-} pour 33% d'ions H_2PO_4^- à température ambiante. En combinant ces résultats avec l'analyse du rapport Ca/P estimé à 1/3, nous en déduisons que nos résultats convergent vers le modèle des clusters de calcium triphosphates $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)(\text{HPO}_4)_2]^{3-}$, en accord avec Habraken *et al.*¹³.

Enfin, l'étude par ^{43}Ca DNP MAS a permis de découvrir une nouvelle méthodologie pour l'étude des complexes de calcium en solution. D'une manière ou d'une autre, les complexes de calcium

contenant du ^{43}Ca se comportent plus ou moins comme des spins $\frac{1}{2}$ lorsque vitrifiés. D'un point de vue spectroscopique, cela permet d'utiliser des séquences classiques pour les spins $\frac{1}{2}$ et de s'affranchir des contraintes sur les noyaux quadripolaires. Entre autres, l'utilisation d'un CP « haute puissance » confère un gain de sensibilité substantiel (> 100) par rapport au CP quadripolaire « basse puissance ». Les conséquences sur l'étude des complexes de calcium sont directes, car la gamme physiologique de concentration peut facilement être sondée, à condition de pouvoir enrichir le milieu en ^{43}Ca . Si l'acquisition d'un spectre CPMAS satisfaisant s'avère suffisamment rapide, cela ouvre le champ des possibles en termes d'expériences bidimensionnelles (Hetcor, spin-diffusion, multiquanta, CSA, Redor, etc...) permettant d'obtenir des informations inédites telles que la détermination de sites de complexation ou de distances atomiques. Dans notre étude, les agents complexant avaient des poids moléculaires relativement faibles, il conviendrait ainsi d'essayer la méthodologie sur des ligands plus conséquents, tels que des polymères ou des protéines. Enfin, la méthodologie a fonctionné sur le ^{43}Ca , mais il serait intéressant de l'essayer sur d'autres noyaux quadripolaires connus pour former des complexes, tels que le ^{25}Mg ou le ^{87}Sr . Si les 2 derniers points clés évoqués s'avèrent fonctionner, cette méthodologie pourrait s'avérer très intéressante pour l'étude de complexes biochimiques dans le cadre de la recherche en chimie médicinale/pharmaceutique ou de la chimie biologique.

Références bibliographiques

- (1) Betts, F.; Posner, A. S. An X-Ray Radial Distribution Study of Amorphous Calcium Phosphate. *Mater. Res. Bull.* 1974, 9 (3), 353–360. [https://doi.org/10.1016/0025-5408\(74\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0025-5408(74)90087-7).
- (2) Posner, A. S.; Betts, F. Synthetic Amorphous Calcium Phosphate and Its Relation to Bone Mineral Structure. *Acc. Chem. Res.* 1975, 8 (8), 273–281. <https://doi.org/10.1021/ar50092a003>.
- (3) Mahamid, J.; Sharir, A.; Addadi, L.; Weiner, S. Amorphous Calcium Phosphate Is a Major Component of the Forming Fin Bones of Zebrafish: Indications for an Amorphous Precursor Phase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, 105 (35), 12748–12753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803354105>.
- (4) Landis, W. J.; Glimcher, M. J. Electron Optical and Analytical Observations of Rat Growth Plate Cartilage Prepared by Ultracryomicrotomy: The Failure to Detect a Mineral Phase in Matrix Vesicles and the Identification of Heterodispersed Particles as the Initial Solid Phase of Calcium Phosphate Deposited in the Extracellular Matrix. *J. Ultrastruct. Res.* 1982, 78 (3), 227–268. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(82\)80001-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(82)80001-4).
- (5) Beniash, E.; Metzler, R. A.; Lam, R. S. K.; Gilbert, P. U. P. A. TRANSIENT AMORPHOUS CALCIUM PHOSPHATE IN FORMING ENAMEL. *J. Struct. Biol.* 2009, 166 (2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.02.001>.
- (6) Von Euw, S.; Wang, Y.; Laurent, G.; Drouet, C.; Babonneau, F.; Nassif, N.; Azaïs, T. Bone Mineral: New Insights into Its Chemical Composition. *Sci. Rep.* 2019, 9, 8456. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44620-6>.
- (7) Glimcher, M. J.; Bonar, L. C.; Grynpas, M. D.; Landis, W. J.; Roufosse, A. H. Recent Studies of Bone Mineral: Is the Amorphous Calcium Phosphate Theory Valid? *J. Cryst. Growth* 1981, 53 (1), 100–119. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(81\)90058-0](https://doi.org/10.1016/0022-0248(81)90058-0).
- (8) Crane, N. J.; Popescu, V.; Morris, M. D.; Steenhuis, P.; Ignelzi, M. A. Raman Spectroscopic Evidence for Octacalcium Phosphate and Other Transient Mineral Species Deposited during Intramembranous Mineralization. *Bone* 2006, 39 (3), 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.059>.
- (9) Dey, A.; Bomans, P. H. H.; Müller, F. A.; Will, J.; Frederik, P. M.; With, G. de; Sommerdijk, N. A. J. M. The Role of Prenucleation Clusters in Surface-Induced Calcium Phosphate Crystallization. *Nat. Mater.* 2010, 9 (12), 1010–1014. <https://doi.org/10.1038/nmat2900>.
- (10) Du, L.-W.; Bian, S.; Gou, B.-D.; Jiang, Y.; Huang, J.; Gao, Y.-X.; Zhao, Y.-D.; Wen, W.; Zhang, T.-L.; Wang, K. Structure of Clusters and Formation of Amorphous Calcium Phosphate and Hydroxyapatite: From the Perspective of Coordination Chemistry. *Cryst. Growth Des.* 2013, 13 (7), 3103–3109. <https://doi.org/10.1021/cg400498j>.
- (11) Mancardi, G.; Tamargo, C. E. H.; Tommaso, D. D.; Leeuw, N. H. de. Detection of Posner's Clusters during Calcium Phosphate Nucleation: A Molecular Dynamics Study. *J. Mater. Chem. B* 2017, 5 (35), 7274–7284. <https://doi.org/10.1039/C7TB01199G>.
- (12) Lin, T.-J.; Chiu, C.-C. Structures and Infrared Spectra of Calcium Phosphate Clusters by Ab Initio Methods with Implicit Solvation Models. *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP 2017, 20 (1), 345–356. <https://doi.org/10.1039/c7cp05975b>.
- (13) Habraken, W. J. E. M.; Tao, J.; Brylka, L. J.; Friedrich, H.; Bertinetti, L.; Schenk, A. S.; Verch, A.; Dmitrovic, V.; Bomans, P. H. H.; Frederik, P. M.; Laven, J.; Schoot, P. van der; Aichmayer, B.; With, G. de; DeYoreo, J. J.; Sommerdijk, N. A. J. M. Ion-Association Complexes Unite Classical

- and Non-Classical Theories for the Biomimetic Nucleation of Calcium Phosphate. *Nat. Commun.* 2013, 4 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms2490>.
- (14) Yang, X.; Wang, M.; Yang, Y.; Cui, B.; Xu, Z.; Yang, X. Physical Origin Underlying the Prenucleation-Cluster-Mediated Nonclassical Nucleation Pathways for Calcium Phosphate. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019, 21 (27), 14530–14540. <https://doi.org/10.1039/C9CP00919A>.
- (15) Mancardi, G.; Terranova, U.; de Leeuw, N. H. Calcium Phosphate Prenucleation Complexes in Water by Means of Ab Initio Molecular Dynamics Simulations. *Cryst. Growth Des.* 2016, 16 (6), 3353–3358. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00327>.
- (16) Garcia, N. A.; Malini, R. I.; Freeman, C. L.; Demichelis, R.; Raiteri, P.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Harding, J. H.; Gale, J. D. Simulation of Calcium Phosphate Prenucleation Clusters in Aqueous Solution: Association beyond Ion Pairing. *Cryst. Growth Des.* 2019, 19 (11), 6422–6430. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00889>.
- (17) Bryce, D. L. Calcium Binding Environments Probed by (43)Ca NMR Spectroscopy. *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003 2010, 39 (37), 8593–8602. <https://doi.org/10.1039/c0dt00416b>.
- (18) Lee, D.; Leroy, C.; Crevant, C.; Bonhomme-Coury, L.; Babonneau, F.; Laurencin, D.; Bonhomme, C.; De Paëpe, G. Interfacial Ca²⁺ Environments in Nanocrystalline Apatites Revealed by Dynamic Nuclear Polarization Enhanced 43 Ca NMR Spectroscopy. *Nat. Commun.* 2017, 8 (1), 14104. <https://doi.org/10.1038/ncomms14104>.
- (19) Barrie, P. J. Distorted Powder Lineshapes in 27 Al CP / MAS NMR Spectroscopy of Solids. *Chem. Phys. Lett.* 1993, 208 (5), 486–490. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(93\)87177-5](https://doi.org/10.1016/0009-2614(93)87177-5).
- (20) Alberic, M.; Caspi, E.; Bennet, M. A.; Ajili, W.; Nassif, N.; Azaïs, T.; Berner, A.; Fratzl, P.; Zolotoyabko, E.; Bertinetti, L.; Politi, Y. The Interplay between Calcite, Amorphous Calcium Carbonate and Intra-Crystalline Organics in Sea Urchin Skeletal Elements. *Cryst. Growth Des.* 2018, 18 (4), 2189. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01622>.
- (21) Epasto, L. M.; Georges, T.; Selimović, A.; Guigner, J.-M.; Azaïs, T.; Kurzbach, D. Formation and Evolution of Nanoscale Calcium Phosphate Precursors under Biomimetic Conditions. *Anal. Chem.* 2021, 93 (29), 10204–10211. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01561>.
- (22) Mekmene, O.; Quillard, S.; Rouillon, T.; Bouler, J.-M.; Piot, M.; Gaucheron, F. Effects of PH and Ca/P Molar Ratio on the Quantity and Crystalline Structure of Calcium Phosphates Obtained from Aqueous Solutions. *Dairy Sci. Technol.* 2009, 89 (3), 301–316. <https://doi.org/10.1051/dst/2009019>.
- (23) Vioglio, P. C.; Thureau, P.; Juramy, M.; Ziarelli, F.; Viel, S.; Williams, P. A.; Hughes, C. E.; Harris, K. D. M.; Mollica, G. A Strategy for Probing the Evolution of Crystallization Processes by Low-Temperature Solid-State NMR and Dynamic Nuclear Polarization. *J. Phys. Chem. Lett.* 2019, 10 (7), 1505–1510. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.9b00306>.
- (24) Lilly Thankamony, A. S.; Wittmann, J. J.; Kaushik, M.; Corzilius, B. Dynamic Nuclear Polarization for Sensitivity Enhancement in Modern Solid-State NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2017, 102–103, 120–195. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.06.002>.
- (25) Juramy, M.; Chèvre, R.; Cerreia Vioglio, P.; Ziarelli, F.; Besson, E.; Gastaldi, S.; Viel, S.; Thureau, P.; Harris, K. D. M.; Mollica, G. Monitoring Crystallization Processes in Confined Porous Materials by Dynamic Nuclear Polarization Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* 2021, 143 (16), 6095–6103. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c12982>.
- (26) Turner, G. L.; Smith, K. A.; Kirkpatrick, R. J.; Oldfieldt, E. Structure and Cation Effects on Phosphorus-31 NMR Chemical Shifts and Chemical-Shift Anisotropies of Orthophosphates. *J. Magn. Reson.* 1969 1986, 70 (3), 408–415. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(86\)90129-0](https://doi.org/10.1016/0022-2364(86)90129-0).

- (27) Massiot, D.; Fayon, F.; Capron, M.; King, I.; Le Calvé, S.; Alonso, B.; Durand, J.-O.; Bujoli, B.; Gan, Z.; Hoatson, G. Modelling One- and Two-Dimensional Solid-State NMR Spectra. *Magn. Reson. Chem.* 2002, 40 (1), 70–76. <https://doi.org/10.1002/mrc.984>.
- (28) Wong, A.; Laurencin, D.; Wu, G.; Dupree, R.; Smith, M. E. An Ab Initio Quantum Chemical Investigation of ^{43}Ca NMR Interaction Parameters for the Ca^{2+} Sites in Organic Complexes and in Metalloproteins. *J. Phys. Chem. A* 2008, 112 (40), 9807–9813. <https://doi.org/10.1021/jp801015y>.

Chapitre VI – Caractérisations structurales des phases transitoires solides impliquées dans la formation de l'hydroxyapatite « biomimétique »

CHAPITRE VI – CARACTERISATIONS STRUCTURALES DES PHASES TRANSITOIRES SOLIDES IMPLIQUEES DANS LA FORMATION DE L’HYDROXYAPATITE « BIOMIMETIQUE »	251
I. INTRODUCTION	255
II. MATERIEL ET METHODES	257
1) Conditions de précipitation	257
2) Potentiométrie calcium et pH-métrie	257
3) RMN en solution	257
4) Cryo-TEM	258
5) Microscopie électronique en transmission (TEM)	258
6) RMN à l’état solide du noyau ³¹ P <i>ex situ</i> et cas spéciaux de CAP-1 et de CAP-2	258
7) RMN ³¹ P à l’état solide – autres solides et expériences ²³ Na— ³¹ P	259
8) RMN ⁴³ Ca à l’état solide	259
9) MAS-DNP ⁴³ Ca sur solutions vitrifiées	260
10) Diffraction des rayons X	260
11) Analyse thermogravimétrique (ATG)	260
III. SUIVI TEMPOREL DE LA PRECIPITATION	260
1) Rapports Ca/P et spéciation des phosphates	260
2) Suivi spectroscopique par RMN ³¹ P à l’état solide	263
3) Conclusion	266
IV. CARACTERISATION DES ESPECES “POSTNUCLEATION”	267
1) Clusters de postnucléation / CAP-1	267
2) Phase transitoire / CAP-2	278
3) Hydroxyapatite biomimétique	283
4) Présence de sodium : contre-ion ou substitutions cationiques ?	289
V. CONCLUSION	296
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	299

I. Introduction

Ce chapitre est dédié à la suite du processus de formation de l'HAP après nucléation. En particulier, si la phase finale d'hydroxyapatite est bien connue et facilement identifiable par diverses techniques de caractérisation, il subsiste des zones d'ombre concernant la nature des espèces solides transitoires impliquées dans le processus de formation de l'HAP dans des conditions de précipitation proches des conditions physiologiques.

En ce qui concerne la formation de l'HAP *in vivo*, les premiers débats concernant le mécanisme de formation ont pris place dans les années 1960 et 1970. Il a d'abord été proposé que la nucléation hétérogène des cristaux d'apatite prenait place le long de l'axe des fibrilles de collagène^{1,2}. En 1975, Posner propose l'existence d'une phase amorphe dans le minéral osseux³ faisant ainsi naître le débat d'un mécanisme de nucléation en plusieurs étapes. S'il est difficile de savoir si cette phase est réellement amorphe ou si elle manque d'ordre à longue portée du fait de sa faible maturité et de substitutions ioniques⁴, l'usage de modèles inorganiques a permis d'observer de nombreuses espèces transitoires précédant la formation d'hydroxyapatite. Par exemple, pour la synthèse d'hydroxyapatite par diffusion de vapeur de NH₃ on constate la présence successive d'ACP, d'OCP et d'HAP^{5,6}. Précisons que cette méthode de synthèse ne permet pas de contrôler le pH et que les concentrations ($\approx 10^1 - 10^2$ mM) sont bien au-delà des concentrations physiologiques ($\approx 10^0$ mM).

D'autre part, les modèles les plus proches des conditions physiologiques ($[Ca^{2+}] \approx [Pi] \approx$ mM, pH $\approx 7,4$, force ionique ≈ 150 mM) impliquent généralement plusieurs intermédiaires amorphes et cristallins. En 1970, Termine et Posner ont étudié l'influence de différents paramètres de la précipitation sur la cinétique de formation de la première phase amorphe⁷ et de sa transformation en hydroxyapatite⁸. Si à l'époque, la transformation directe de la phase amorphe en HAP a été suggérée, Christoffersen *et al.*⁹ observent par microscopie électronique en 1989 la nucléation d'un premier amorphe ACP1 sous la forme de sphères, évoluant ensuite vers un second amorphe ACP2 ayant une morphologie flocculaire dans des conditions similaires de précipitations. Ce dernier cristalliserait ensuite en OCP avant d'évoluer en HAP⁹.

La première phase amorphe a été décrite comme des agrégats sphériques de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de nm¹⁰, qu'elle soit formée en conditions de concentrations saturées ou sous saturées⁷. Jusqu'il y a quelques années, cette phase amorphe avait été décrite comme ayant un rapport Ca/P de 1,5 et correspondant à la formule chimique Ca₃(PO₄)₂¹¹. D'autre part, Montes-Hernandez et Renard ont identifié plusieurs phases amorphes distinctes à la formation d'HAP par spectroscopie Raman *in-situ*, telles que Ca(HPO₄)_{1-x}(PO₄)_{(2/3)x} (avec $x = 0,2 - 1$) ou le tricalcium phosphate amorphe Ca₃(PO₄)₂·nH₂O¹². Notons toutefois que leurs expériences ont été réalisées à pH > 11 ce qui n'est pas vraiment représentatif des conditions physiologiques et il est légitime de se poser la question de la comparaison à notre système.

En 2010, l'observation de clusters de prénucléation solubles par cryo-TEM est réalisée par Dey *et al.*¹³. Les clusters de prénucléation y sont décrits comme des clusters de Posner Ca₉(PO₄)₆, et l'auteur soutient que ces clusters représentent la brique unitaire de l'ACP, ici décrite comme la phase issue de la nucléation s'agrégeant en sphères de 40 à 80 nm. Si la nature chimique de ces précurseurs amorphes est encore hautement débattue aujourd'hui¹⁴⁻¹⁷, il n'y a que l'étude d'Habraken *et al.*¹⁵ qui discute la structure et la transition des différentes phases transitoires solides précédant la formation

d'hydroxyapatite dans des conditions de précipitation proches de la physiologie. Leurs observations par cryo-TEM sont similaires, mais les auteurs décrivent les espèces de prénucléation comme des unités de calcium triphosphate $[\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)]^{3-}$ et les clusters solides formant les sphères d'ACP (appelées ACP1 dans l'étude de Christoffersen *et al.*⁹) comme ayant une composition de type $[\text{Ca}(\text{HPO}_4)_3]^{2-}$. Ces derniers s'agrègeraient ensuite vers ces sphères considérées amorphes par diffraction électronique. Il observe ensuite la formation d'un intermédiaire de type OCP déficient en calcium (appelé ACP2 dans l'étude de Christoffersen *et al.*⁹), puis son évolution en OCP puis en hydroxyapatite (Figure 1). Les clusters solides formant ACP (ou ACP1), aussi appelés « clusters de postnucléation » par Mancardi *et al.*, seront ensuite confirmés comme étant stables par le biais de simulations de dynamique moléculaire¹⁸. L'étude s'appuie entre autres sur de la spectroscopie Raman néanmoins cette spectroscopie vibrationnelle souffre d'une faible résolution spectrale ce qui rend l'interprétation des résultats ambiguë. De plus, l'attribution de la phase d'OCP déficiente en ions calcium se base sur des techniques de diffraction des rayons X dont les résultats sont similaires à une phase de type OCP, mais cela ne permet pas de conclure fermement sur la nature de cette phase à notre sens.

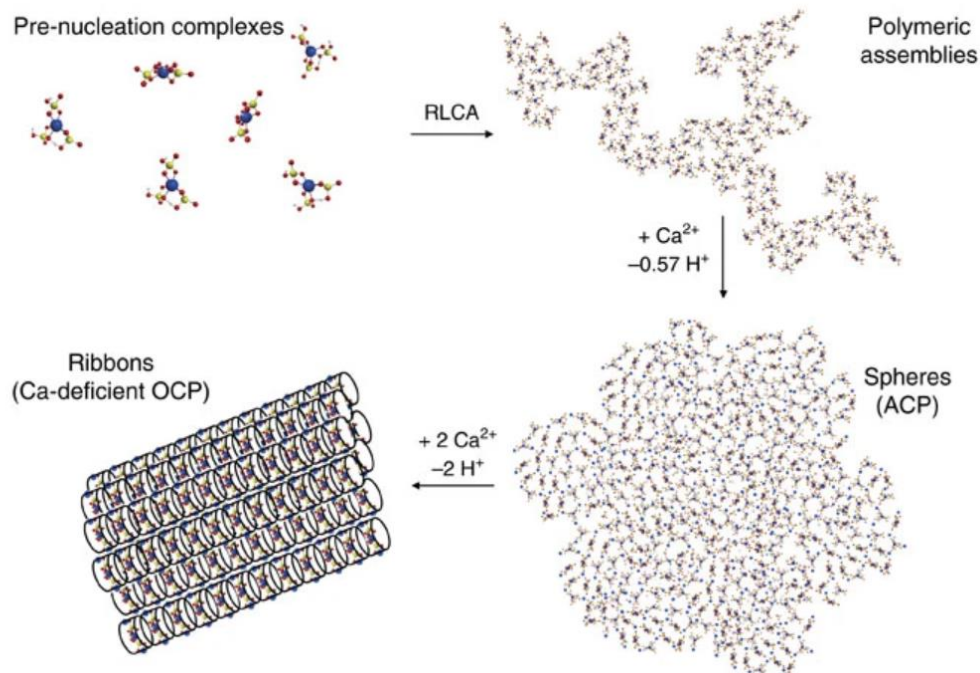


Figure 1 : Mécanisme proposé par Habraken *et al.*¹⁵ : les PNC se forment à partir des ions en solution et s'agrègent en agrégats polymériques. Après la nucléation, les sphères d'ACP ou (ACP1) sont composées des clusters de postnucléation et évoluent ensuite vers des structures flocculaires correspondant à de l'OCP lacunaire (ou ACP2) en ions Ca²⁺.

De ce bref état de l'art, il découle que les conditions de pH, de concentrations ou d'additifs organiques peuvent fortement influencer le mécanisme observé. Ainsi, il semble exister une multitude de mécanismes impliquant diverses espèces transitoires qui, *in fine*, se convertissent en hydroxyapatite. L'apparition d'une phase amorphe est néanmoins souvent observée, néanmoins il existe pléthores de phases amorphes reportées *in vitro* qui dépendent des conditions initiales de la précipitation¹⁹.

Ce chapitre s'inscrit comme la suite du chapitre précédent s'intéressant aux espèces solubles de prénucléation, car il a pour vocation d'apporter des informations structurales pour mieux décrire la structure et les possibles mécanismes de formation des espèces transitoires solides. Pour cela, nous étudierons la condition 1 (cf. chapitre précédent) qui présente un schéma réactionnel similaire à celui observé par Christoffersen *et al.*⁹ et par Habraken *et al.*¹⁵. En raison de leur évolution au cours du temps, nous avons cherché à stabiliser ces phases transitoires. Enfin, nous associons une nouvelle fois des mesures résolues dans le temps avec une étude structurale combinant RMN à l'état solide, diffraction des rayons X et analyse thermogravimétrique. Cela permettra notamment de décrire plus en profondeur les phases observées et décrites par Habraken¹⁵.

II. Matériel et méthodes

Dans un souci de sémantique dans le cadre de ce manuscrit, la première phase solide formée à la suite de la nucléation (appelée ACP ou ACP1 jusqu'à présent dans ce manuscrit ou dans la littérature^{9,15}) sera appelée CAP-1, ou « clusters de postnucléation », car elle concerne les clusters solides s'agrégeant en sphères considérées amorphes. La deuxième phase, issue de l'évolution de CAP-1 sera appelée CAP-2 (aussi appelée OCP lacunaire en ions Ca²⁺ ou ACP2 dans la littérature^{9,15}) ou phase transitoire, cette deuxième dénomination provenant de son très faible temps de vie dans notre condition de précipitation. Nous avons choisi de changer la nomenclature de ces phases précédemment observées dans la littérature car nous allons les caractériser à l'échelle atomique, ce qui n'a pas été réalisé jusqu'à présent.

1) Conditions de précipitation

Même procédure que dans le chapitre V.

2) Potentiométrie calcium et pH-métrie

Même procédure que dans le chapitre V.

3) RMN en solution

Toutes les expériences de RMN en solution ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance III 300 MHz (fréquence de Larmor du proton) équipé avec une sonde BBFO de 5 mm de diamètre. La RMN en solution a été utilisée pour mesurer la quantité de phosphates et d'ions sodium en solution tout au long de la précipitation par l'étude quantitative *in situ* des noyaux ³¹P et ²³Na par intégration des signaux (*Tableau 1*). Pour gagner en précision, un capillaire contenant une quantité connue de NaH₂PO₄ dans du D₂O était inséré dans les tubes RMN contenant la solution minéralisante.

Noyau	Durée de l'impulsion t_{90° (μs)	Séquence utilisée	Temps de répétition des impulsions (s)
^{31}P	10,8	Excitation directe par impulsion 30°	9
^{23}Na	8,7	Excitation directe par impulsion 90°	1,3

Tableau 1. Paramètres d'acquisition des expériences de RMN des noyaux ^{31}P et ^{23}Na en solution.

4) Cryo-TEM

Même procédure que dans le chapitre V.

5) Microscopie électronique en transmission (TEM)

Les échantillons étaient généralement en conditions aqueuses avant l'observation. Une goutte de solution était prélevée et disposée sur une grille de cuivre, l'excédent étant séché avec du papier filtre. La grille était alors transférée à l'intérieur d'un microscope FEI Tecnai Spirit G2 possédant une tension d'accélération de 120 kV. Les images ont été enregistrées à l'aide d'une caméra Gatan CCD Orius.

6) RMN à l'état solide du noyau ^{31}P *ex situ* et cas spéciaux de CAP-1 et de CAP-2

Les caractérisations par RMN à l'état solide *ex situ* ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance-III 500 MHz équipée d'une sonde 7 mm double canaux. Les échantillons CAP-1 et CAP-2 ont été isolés par centrifugation, lavage et redispersion dans de l'éthanol pur avant d'être transférés dans des rotors de 7 mm. Les déplacements chimiques ^1H et ^{31}P ont respectivement été fixés à 0 ppm et 2,8 ppm à l'aide d'une hydroxyapatite de synthèse. La fréquence de rotation à l'angle magique (ν_R) était fixée à $\nu_R = 3\text{-}5$ kHz selon les expériences.

Les expériences de polarisation croisée $^1\text{H}\text{--}^{31}\text{P}$ ($\nu_{\text{MAS}} = 5$ kHz) ont été réalisées à des champs effectifs ν_{RF} respectifs de 50 et 60 kHz avec un découplage proton de 50 kHz. Le délai de répétition des impulsions était typiquement fixée à 1 seconde et le temps de contact (t_{CP}) utilisé était 1 ms. Les expériences de polarisation croisée $^1\text{H}\text{--}^{31}\text{P}$ à des fréquences de rotation de 3 kHz ont été réalisées à des ν_{RF} respectifs de 50 et 53 kHz avec un découplage proton de 50 kHz. Le délai de répétition entre les impulsions était typiquement fixé à 1 seconde et le t_{CP} utilisé était 1 ms.

Les acquisitions directes ^{31}P ont été réalisées en utilisant un pulse de 30° ayant un champ effectif de 55 kHz avec un découplage proton de 50 kHz. Le délai de répétition entre les impulsions était typiquement fixé à 40 secondes.

Les spectres 2D $^1\text{H}\text{--}^{31}\text{P}$ Hetcor ont été enregistrés en 32—48 scans et 64—128 incréments t_1 avec un mode d'acquisition States-TPPI. L'expérience de recouplage dipolaire homonucléaire $^{31}\text{P}\text{--}^{31}\text{P}$ SPC5 a été réalisée avec une excitation par polarisation croisée en utilisant 30 cycles SPC5 d'excitation

et de reconversion sous un champ de recouplage égal à 25 kHz. L'expérience a consisté à enregistrer 128 incréments t_1 avec un mode d'acquisition States-TPPI.

7) RMN ^{31}P à l'état solide – autres solides et expériences ^{23}Na — ^{31}P

Tous les autres solides ont été caractérisés sur un spectromètre Bruker possédant une fréquence de Larmor du proton égale à 300 MHz. Les caractérisations par RMN ^{31}P ont été réalisées avec une sonde double résonance de 4 mm. Les caractérisations par RMN ^{23}Na ont été réalisées avec une sonde double résonance de 7 mm sur des échantillons lyophilisés. Enfin, les caractérisations en triple résonance ^1H — ^{31}P — ^{23}Na ont été réalisées avec une sonde triple résonance de 4 mm. Si les échantillons étaient étudiés en conditions sèches, les solides étaient transférés dans des rotors classiques de 4 mm. Si les échantillons nécessitaient d'être étudiés en conditions humides (dans de l'eau distillée ou de l'éthanol absolu), les échantillons étaient transférés dans des rotor de 4 mm incluant typiquement 2 inserts en Teflon à la base et au sommet du rotor. La vitesse de rotation, si non mentionnée, était typiquement fixée à 5 kHz.

Les expériences de polarisation croisée et par acquisition directe ^{31}P utilisaient des champs radiofréquences de 48 et 53 kHz sur les voies proton (découplage compris) et ^{31}P , respectivement. La répétition entre les impulsions était typiquement comprise entre 0,5 et 2 secondes selon les échantillons. Le temps de contact utilisé était soit de 1 ms de manière à exalter les contributions autres que l'HAP, ou à 10 ms lorsque l'on souhaitait être plus sélectif sur le signal d'HAP. Les expériences bidimensionnelles ^1H — ^{31}P Hetcor ont consisté à enregistrer 256 incréments t_1 . Les expériences ^{31}P — ^{31}P CP DARR ont été enregistrés en appliquant un champ radiofréquence de 4,5 kHz pendant le temps de mélange (fixé à 222 ms ou 222 μs) et en enregistrant 120 incréments t_1 à une vitesse de rotation de 4,5 kHz.

Les expériences par polarisation croisée et par acquisition directe ^{23}Na utilisaient des champs radiofréquences de 23 kHz et 33 kHz sur les voies proton (découplage compris) et sodium, respectivement avec un t_{CP} de 500 μs . L'expérience ^1H — ^{23}Na HetCor a été réalisée en enregistrant 80 incréments t_1 .

Les expériences suivantes ont été enregistrées à une fréquence de rotation de 10 kHz. Les expériences de recouplage dipolaire hétéronucléaire REDOR ^{23}Na — ^{31}P ont été enregistrées avec une excitation par polarisation croisée sur le noyau ^{23}Na avec des pulses 180° fixées à 7 μs sur les 2 noyaux ^{31}P et ^{23}Na . Les expériences de corrélation ^{23}Na — ^{31}P CP-D-HMQC ont été enregistrés avec la séquence de recouplage SR4^2_1 avec un temps de recouplage de 800 μs et des pulses 180° de 7 μs sur les voies ^{31}P et ^{23}Na .

8) RMN ^{43}Ca à l'état solide

Les expériences de RMN ^{43}Ca à l'état solide ont été réalisées sur un spectromètre Bruker opérant à 700 MHz (fréquence de Larmor du proton). Afin d'améliorer la sensibilité, CAP-1 a été obtenu à partir d'une solution de phosphates de calcium enrichie à 20% en ^{43}Ca . Le solide a immédiatement été suspendu dans une solution d'éthanol pur. L'acquisition directe ^{43}Ca a été réalisée par un bloc DFS

de 2,8 ms de longueur utilisant un champ radiofréquence de 8,4 kHz (balayage de fréquence de 400 à 25 kHz) suivi d'un pulse sélectif de 3 μ s. Le délai entre les scans était fixé à 0,33s.

9) MAS-DNP ^{43}Ca sur solutions vitrifiées

Les clusters de postnucléation ont été caractérisés avec un spectromètre Bruker opérant à 400 MHz (fréquence de Larmor ^1H) couplé à un gyrotron (263 GHz). Les solutions étaient préparées dans un mélange composé à 20% de glycérol- d_8 , de 30% de D_2O et de 50% de H_2O . Le radical utilisé était AMUPol à raison de 15 mM. Après un temps de réaction défini, la solution était centrifugée dans un rotor en saphir de 3,2 mm de diamètre qui était ensuite introduit dans le spectromètre refroidi à 100K de manière à vitrifier la solution colloïdale. Le rotor était ensuite mis en rotation à une fréquence de 8 kHz. Le déplacement chimique ^{43}Ca a été fixé par rapport à une solution de CaCl_2 saturée à température ambiante, alors que le déplacement chimique ^1H a été fixé à l'aide d'une hydroxyapatite de synthèse.

Les expériences par polarisation croisée ont été réalisées avec des champs RF effectifs de 56 et 32 kHz sur les voies ^1H et ^{43}Ca , respectivement. Le découplage proton était fixé à 67 kHz. Les gains en intensité conférés par la DNP ont été calculés comme les rapports des intensités avec et sans micro-ondes et ont été estimés entre 70 et 110 sur la voie proton. Le délai entre les impulsions était optimal à 4 s et le temps de contact utilisé était de 3 ms. L'expérience LGHetcor a consisté à enregistrer 32 incréments t_1 en utilisant un champ RF de découplage homonucléaire de 90 kHz de type FSLG.

10) Diffraction des rayons X

Les poudres lyophilisées ont été analysées par un diffractomètre Bruker D8 Advance équipé d'un détecteur Lynx eye utilisant la raie $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). Les diffractogrammes ont été enregistrés entre 10° et 60° en 2θ avec un pas de $0,0215^\circ$ et une durée d'acquisition de 1 seconde par point.

11) Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les analyses thermogravimétriques ont été réalisées à l'aide d'une thermo-microbalance NETZSCH STA 409PC. Les expériences ont été conduites sur les échantillons lyophilisés sous air, de la température ambiante jusqu'à 450°C avec une vitesse de chauffe de 5°C par minute.

III. Suivi temporel de la précipitation

1) Rapports Ca/P et spéciation des phosphates

Reprenons l'analyse des rapports Ca/P et H^+ _{relargué}/cluster déterminés sur la condition 1 de précipitation par potentiométrie calcium et pH-métrie ainsi que par l'analyse *in situ* quantitative par RMN ^{31}P en solution dans le chapitre précédent (Figure 2). Alors que l'évolution du rapport Ca/P indique l'insertion de plus en plus d'ions calcium dans la structure des solides (Figure 2A), le rapport

$H^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$ (Figure 2B) permet d'estimer la spéciation des ions phosphates dans la structure. Les différents domaines indiqués de A à D correspondent respectivement aux temps d'observation :

- Des espèces de prénucléation observés entre 0 et 30 minutes.
- Des clusters de postnucléation purs CAP-1 formant les sphères amorphes (aussi précédemment appelés ACP dans ce manuscrit et ACP1 dans la littérature^{9,15}) observés entre 30 et 120 minutes.
- Des espèces transitoires observées CAP-2 pures (précédemment appelées OCP déficient/lacunaire en ions Ca^{2+} ou ACP2 dans la littérature^{9,15}) entre 150 et 180 minutes.
- De l'hydroxyapatite biomimétique observée à partir de 260 minutes.

Les rapports Ca/P et $H^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$ de ces différentes phases sont reportés dans le *Tableau 2* ci-dessous. En particulier, les rapports Ca/P sont en accord avec les résultats décrits dans le chapitre 2, eux-mêmes en accord avec les conclusions tirées par Habraken *et al.*¹⁵.

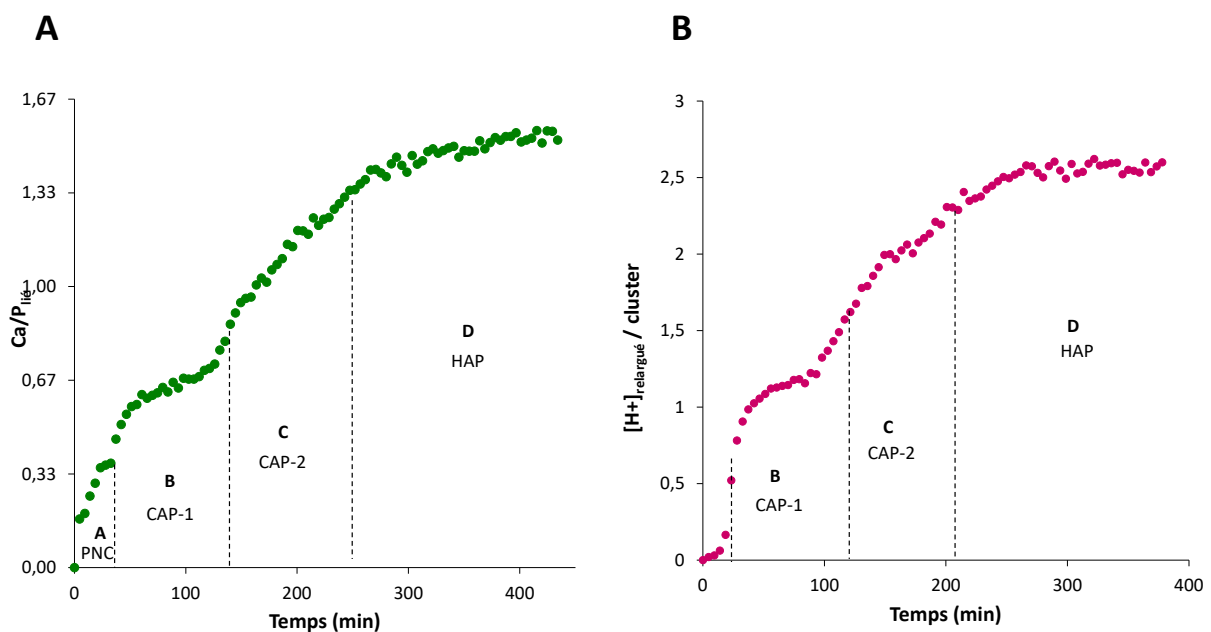


Figure 2 : Evolution des rapports (A) $Ca/P_{\text{lié}}$ et (B) $H^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$ au cours du temps pour la condition 1 de minéralisation.

Phase	$Ca/P_{\text{lié}}$	$H^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$
PNC	0,33	0
CAP-1	0,66	1
CAP-2	$1 \leq Ca/P_{\text{lié}} \leq 1,33$	2
HAP	1,5	2,6

Tableau 2. Rapports Ca/P et $H^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$ dans les différentes phases transitoires. Les valeurs sont choisies dans les zones de stabilité des courbes. En particulier, CAP-2 est seulement observable sur quelques minutes.

Si nous admettons que les espèces de prénucléation sont des ions calcium triphosphates de formule chimique $[\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)]^{3-}$, il est possible de déterminer directement les formules chimiques moyennes des différentes phases transitoires solides à partir des rapports Ca/P et $\text{H}^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$.

La déprotonation d'un ion phosphate par cluster de prénucléation, dont la spéciation est de 33% d'ions H_2PO_4^- pour 67% d'ions HPO_4^{2-} permet de décrire la spéciation de CAP-1 comme étant uniquement composée d'ions HPO_4^{2-} . Combinant cette spéciation à un rapport Ca/P de 0,66 permet de proposer que CAP-1 a une formule chimique proche de $[\text{Ca}_{2n}(\text{HPO}_4)_{3n}]^{2n-}$, où $n \geq 1$. Ce cas considère le résultat proposé par Habraken *et al.*¹⁵ (de $[\text{Ca}_2(\text{HPO}_4)_3]^{2-}$) mais n'écarte pas la possibilité qu'un cluster de postnucléation soit issu de l'association de plusieurs PNC. Par la suite, la phase transitoire présente des valeurs moins stables de rapport Ca/P pour un proton supplémentaire relargué par cluster de prénucléation. La suite de l'analyse considère que la phase est composée de 6 phosphates, du fait des valeurs non entières de Ca/P détectées. Les valeurs de Ca/P sont comprises entre 1 et 1,33 ce qui correspondrait à l'inclusion de 2 à 4 nouveaux ions calcium dans la structure pour 2 phosphates déprotonés. La phase CAP-2 correspondrait alors à $[\text{Ca}_{6+n}(\text{HPO}_4)_4(\text{PO}_4)_2]^{-2+2n}$ où $0 \leq n \leq 2$.

Le passage à HAP s'accompagne du relargage d'un demi proton par cluster, soit d'un proton par groupe de 6 ions phosphates. A ce stade, il convient de préciser que le profil calculé de déprotonation correspond à des valeurs moyennes. Ainsi, un proton relargué ne suggère pas nécessairement que l'entièreté des phosphates perde un proton, des effets de moyenne pouvant être camouflés. Par exemple, lors de la dernière transition, la perte d'un proton par groupe de 6 phosphates en moyenne pourrait aussi signifier qu'un groupe de 6 phosphates se déprotonne 2 fois pendant qu'un autre groupe de 6 phosphates garde le même état de protonation. En effet, nous obtenons de l'hydroxyapatite à la fin de la réaction, laquelle est composée d'un cœur cristallin et d'une surface amorphe. L'hydroxyapatite stœchiométrique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ est totalement déprotonée ce qui correspondrait à un rapport $\text{H}^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$ de 5 (4 pour obtenir 6 groupements PO_4^{3-} ; 5 pour ajouter les ions hydroxyles OH^-). Cependant, nous remarquons un écart à la stœchiométrie car nous détectons un rapport $\text{H}^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$ moyen d'environ 2,6. Cela signifie nécessairement que la couche de surface amorphe n'est pas totalement déprotonée et qu'elle doit avoir un rapport $\text{H}^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$ inférieur à 2,6, c'est-à-dire qu'elle contiendrait des ions HPO_4^{2-} , comme précédemment proposé dans la littérature^{20,21}. Cela est notamment conforté par les mesures de $\text{Ca}/\text{P}_{\text{lié}}$ obtenues pour l'HAP comprises entre 1,4 et 1,55. Ces valeurs sont moyennes et prennent en compte les rapports Ca/P du cœur apatitique et de la couche de surface amorphe, suggérant que cette dernière a un rapport Ca/P plus faible $\leq 1,55$ (Figure 3).

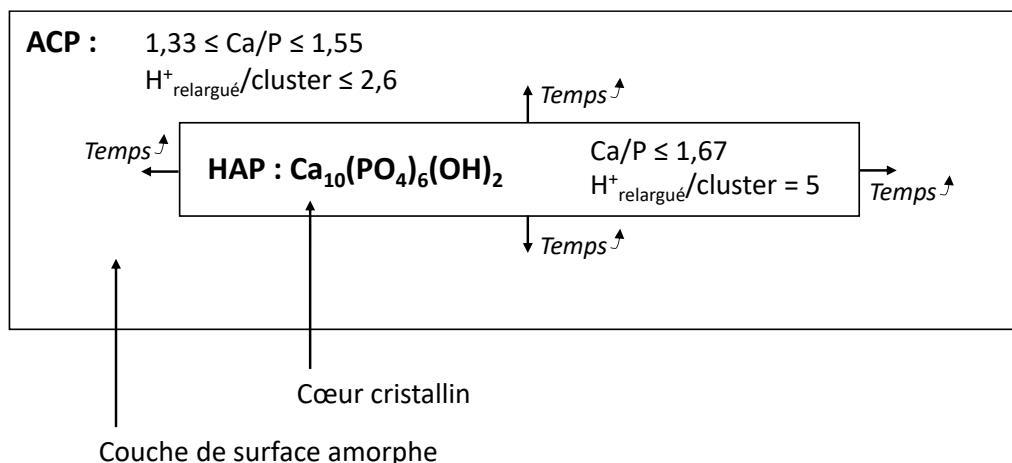


Figure 3 : Représentation schématique de la couche de surface amorphe autour d'un cœur cristallin d'hydroxyapatite. Au cours du temps, la partie cristalline croît au détriment de la contribution amorphe de surface.

Précisons que l'ensemble de ces résultats découlent de l'hypothèse de continuité des ions phosphates dans les PNC et dans CAP-1. De plus, les compositions énoncées jusque-là correspondent à des compositions moyennes. Dans le reste du chapitre, nous nous efforcerons de réaliser des analyses structurales sur les phases pures, de manière à infirmer ou confirmer ces compositions.

2) Suivi spectroscopique par RMN ^{31}P à l'état solide

Là où la RMN ^{31}P en solution nous renseigne sur la quantification et l'évolution des ions phosphates en solution, la RMN ^{31}P à l'état solide permet de sonder la structure des phases solides formées, sur la base du déplacement chimique, du nombre de raies ou bien de leur anisotropie de déplacement chimique. Pour cela, l'utilisation de la polarisation croisée $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ permet de détecter les espèces protonées ou en proximité vicinale avec des espèces protonées tout en appliquant un filtre sur les espèces mobiles (c'est-à-dire solvatées, qui ne seront pas détectées par CP)²². Ici, les principaux problèmes rencontrés proviennent de la quantité de la phase solide nucléant de la solution qui est trop faible pour obtenir suffisamment de signal. Cela signifie qu'il faut concentrer le solide formé après la nucléation, *i.e.* qu'on ne peut pas se contenter d'insérer directement la solution avant la nucléation.

Premièrement, la quantité de liquide que l'on peut placer dans un rotor de 4–7 mm est de l'ordre de la dizaine à la centaine de microlitres, ce qui induit une faible quantité de solide dans le cas de notre expérience de minéralisation. Par ailleurs, la rotation des rotors à l'angle magique (plusieurs kHz) contenant des solutions peut s'avérer risquée car la rotation crée un vortex qui peut perturber la répartition de la masse dans le rotor voire pousser le bouchon, ce qui peut entraîner un crash rotor. Pour pallier à ce deuxième problème, l'utilisation d'inserts en Kel-F ou bien de rotors HR-MAS, sont généralement de mise²³. S'agissant de pièces supplémentaires à introduire dans le rotor pour garantir l'étanchéité de l'échantillon, cela induit forcément un volume réduit de solution et *in fine* une perte de sensibilité. Dans notre cas, nous avons décidé d'utiliser un rotor de 7 mm de diamètre équipé d'inserts en Kel-F à la base et au sommet, de manière à pouvoir injecter un maximum de volume ($\approx 90 \mu\text{L}$) à l'intérieur de ce dernier.

Néanmoins, cela ne permettait pas d'acquiescer un spectre satisfaisant avec une résolution temporelle suffisante pour sonder le processus de cristallisation à partir du mélange initial. De ce fait, nous avons dû attendre la nucléation avant de centrifuger environ 36 mL de solutions de manière à concentrer le rotor de clusters de postnucléation. A ce stade de la précipitation, environ 55% des ions phosphates (Chapitre V, Figure 3) et environ 31% des ions calcium (Chapitre V, Figure 1) sont liés. Nous avons donc calculé que dans un volume de 90 μL , les concentrations respectives en ions calcium et phosphates étaient de 534 et 612mM. De ce fait, nous avons resuspendu la phase solide centrifugée dans 90 μL d'une solution de CaCl_2 à 415 mM de manière à se placer dans des conditions analogues à la condition 1 de minéralisation (pH, force ionique et rapport Ca/P initial). De cette manière, nous avons pu obtenir un rapport signal-sur-bruit satisfaisant avec une résolution temporelle d'un spectre toutes les 5 minutes.

Les résultats sont présentés en Figure 4. Dans un premier temps, on observe un spectre relativement stable avec un massif d'un minimum de 4 signaux présents entre 5 et 20 minutes. L'ensemble de ces signaux évolue ensuite en un 2^{ème} massif de signaux stable entre 25 et 35 minutes. Ce dernier s'affine ensuite avec le temps, laissant place à un minimum de 2 résonances plus fines stables, n'évoluant plus pendant 1 semaine. Cette expérience semble décrire les mêmes processus que les suivis temporels par potentiométrie et RMN ^{31}P en solution car 3 phases solides distinctes sont détectées. Le premier ensemble de signaux correspondrait à la signature spectrale des clusters de postnucléation. La largeur des signaux semble contradictoire avec l'hypothèse d'une phase amorphe avancée par le passé^{9,15}. De plus, la multiplicité des signaux semble infirmer la phase de $[\text{Ca}_2(\text{HPO}_4)_3]^{2-}$ précédemment décrite. Le massif apparaissant ensuite serait CAP-2, du fait de son apparition entre les clusters de postnucléation et la phase finale. Sa signature spectrale ne ressemble pas à de l'OCP qui n'a jamais été observée lors de ce travail de thèse. Enfin, l'hydroxyapatite biomimétique est détectée en tant que dernière phase. En effet, sa résonance la plus intense se situe à 2,85 ppm ce qui est très proche du signal théorique de 2,80 ppm de l'hydroxyapatite. Nous notons la présence d'un épaulement sur la droite de ce signal qui pourrait correspondre à la couche de surface amorphe.

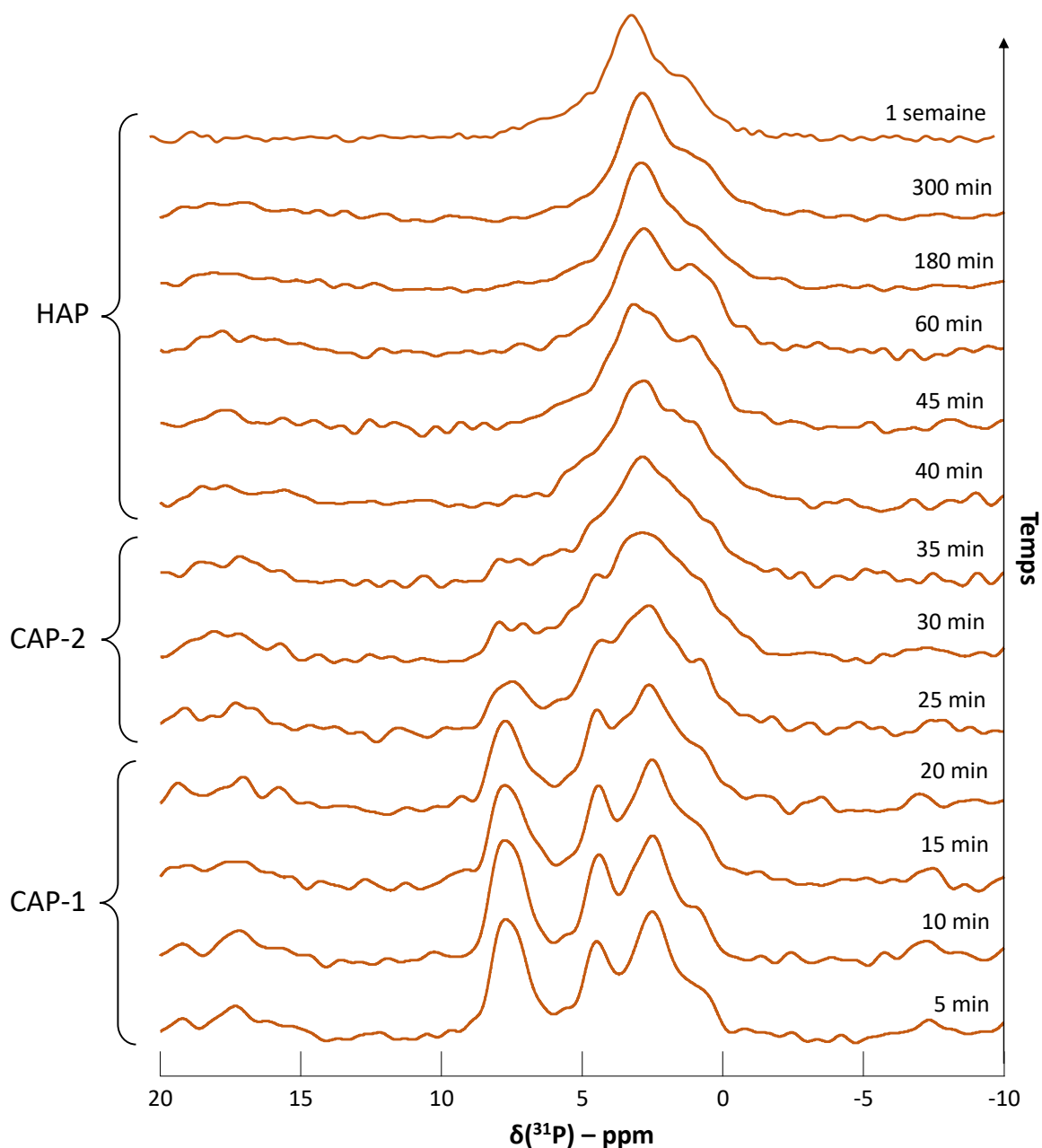


Figure 4 : Suivi spectroscopique par RMN CP MAS du ^{31}P à l'état solide (3 kHz, temps de contact = 1 ms).

Pour être sûr de cette dernière attribution, nous avons enregistré une expérience bidimensionnelle, ^1H — ^{31}P Hetcor (Figure 5), de manière à corréler les environnements ^1H et ^{31}P voisins dans l'espace. Dans cette dernière, nous avons utilisé un découplage homonucléaire FSLG dans la voie ^1H pour améliorer la résolution²⁴, ainsi que d'éloigner les bandes de rotation (facteur d'échelle) pouvant être handicapante à faible vitesse de rotation dans cette même dimension. Nous constatons la corrélation du signal à 2,85 ppm avec le signal à 0 ppm dans la dimension indirecte ^1H . Ce dernier est caractéristique des ions OH^- présents dans l'hydroxyapatite. Le 2^{ème} signal à 1,1 ppm dans la dimension directe ^{31}P corréle avec un signal à 4,7 ppm et un large signal s'étendant de 6 à 18 ppm dans la direction indirecte ^1H . Ces déplacements chimiques sont typiques de l' H_2O et de liaisons $\text{P}-\text{OH}$, ce qui suggère que cette 2^{ème} phase est hydratée et contient des ions HPO_4^{2-} . Il pourrait s'agir de la couche amorphe de surface précédemment décrite dans plusieurs études²¹. En particulier, ce signal a déjà été

observé par Eichert *et al.*²⁵ dans des hydroxyapatites synthétiques étudiées en conditions humides et que celui-ci disparaissait de manière irréversible une fois l'échantillon séché. Nous irons plus loin dans l'analyse de ce signal dans ce chapitre.

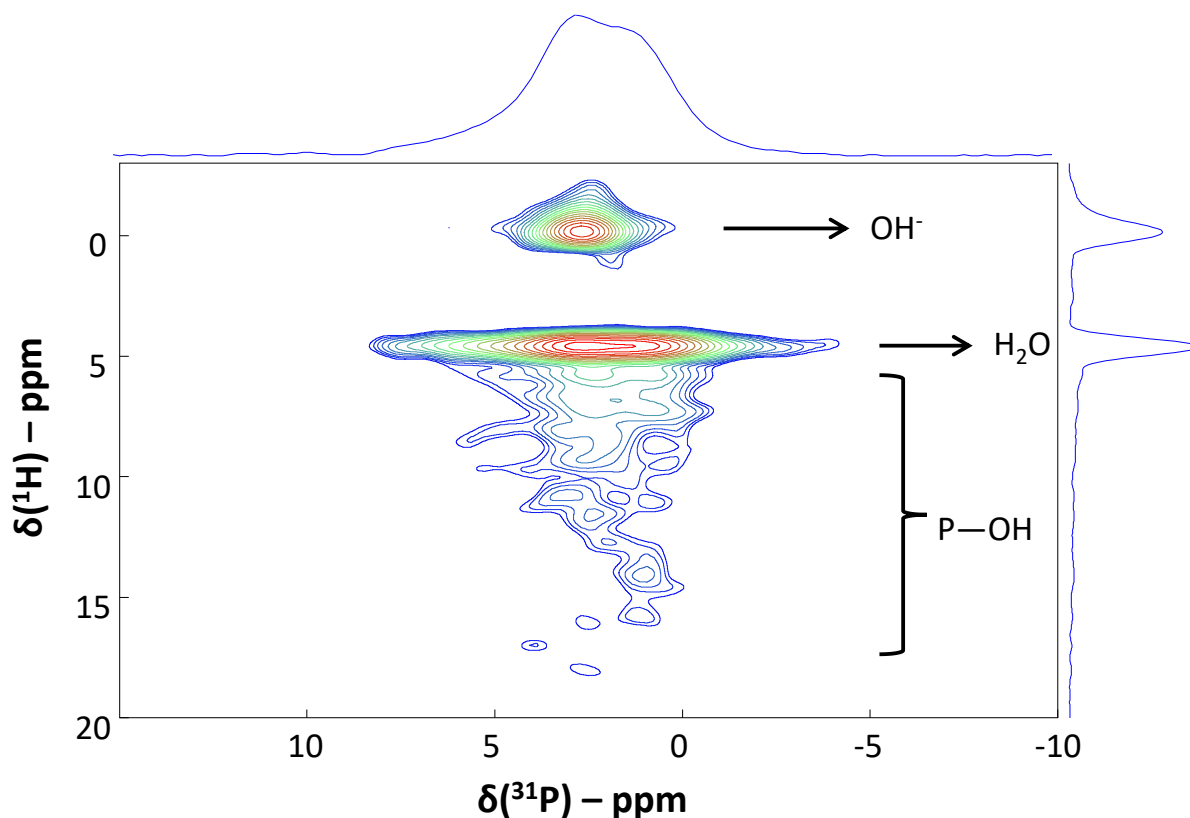


Figure 5 : $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ Hetcor avec découplage homonucléaire FSLG après 1 semaine. Temps de contact = 1 ms.

3) Conclusion

Les méthodes de caractérisations dynamiques apportent des informations précieuses sur la cinétique, la chimie et la mécanistique lorsqu'il s'agit d'étudier des mécanismes non classiques. Les profils d'intégrations des ions calcium et phosphates dans la structure ont été déterminés dans le cadre de la formation d'hydroxyapatite, ce qui a permis de décrire l'évolution du rapport Ca/P des différentes phases se formant au cours du temps. Un suivi minutieux du pH en solution a permis de décrire l'état de protonation des ions phosphates dans ces mêmes phases. En l'occurrence, CAP-1 et CAP-2 sont décrits comme ayant les compositions moyennes respectives $[\text{Ca}_{2n}(\text{HPO}_4)_{3n}]^{2n-}$ et $[\text{Ca}_{6+n}(\text{HPO}_4)_4(\text{PO}_4)_2]^{2+2n}$. Mentionnons toutefois que les données observées sont moyennes et ne permettent pas d'assurer sans ambiguïtés l'attribution des formules déterminées dans cette partie. Comme illustré tout au long de cette première partie, il est difficile de caractériser la structure des phases impliquées lors des phénomènes de prénucléation, nucléation et cristallisation de l'hydroxyapatite. Seule la dernière phase, l'hydroxyapatite biomimétique, est facilement caractérisable due à sa structure thermodynamiquement stable. Les spectres obtenus en RMN à l'état solide *in situ* nous ont permis

d'obtenir une signature spectrale des différentes phases solides impliquées. Nous allons maintenant tenter d'isoler et stabiliser ces phases pour pouvoir les étudier plus en détails.

IV. Caractérisation des espèces “postnucléation”

1) Clusters de postnucléation / CAP-1

La première phase solide apparaissant après la nucléation est CAP-1. Pour isoler et caractériser cette phase, nous avons suivi différentes stratégies. De manière générale, cette phase a été préparée via des grands volumes initiaux de solution de manière à obtenir suffisamment de poudre. Le solide était généralement obtenu après filtration ou centrifugation et lavage à l'eau distillée après un suivi potentiométrique de manière à être sûr de stopper l'avancement de la réaction à la bonne étape. Parallèlement, nous avons prélevé quelques microlitres de la solution à cet instant pour observer la morphologie de cette phase par cryo-TEM (Figure 6A). Rapidement, le solide humide filtré obtenu a été isolé suivant 2 méthodologies :

- Resuspension dans de l'éthanol absolu.
- Plongeon dans de l'azote liquide puis lyophilisation pendant une nuit.

Les CAP-1 obtenus par ces 2 approches ont ensuite été observés par TEM (Figure 6B, Figure 6C). On peut constater que les 3 états (natifs, dans l'éthanol et lyophilisés) de cette phase semblent présenter la même morphologie. Cette phase se présente sous la forme de particules sphériques de plusieurs dizaines (40—200 nm) de nanomètres de diamètre qui semblent résulter de l'agrégation de particules plus petites d'environ 2 nm, les clusters de postnucléation. Néanmoins, les tailles diffèrent selon la préparation de l'échantillon (100 nm en cryo-TEM, 200 nm en TEM, 40 à 100 nm dans l'éthanol). Nous remarquons que les agrégats sphériques évoluant dans l'eau sont relativement monodispersés, ce qui n'est pas le cas lorsque CAP-1 est redispersé dans de l'éthanol. Cette polydispersité peut s'expliquer par des effets de solvants limitant le niveau d'agrégation des clusters de postnucléation.

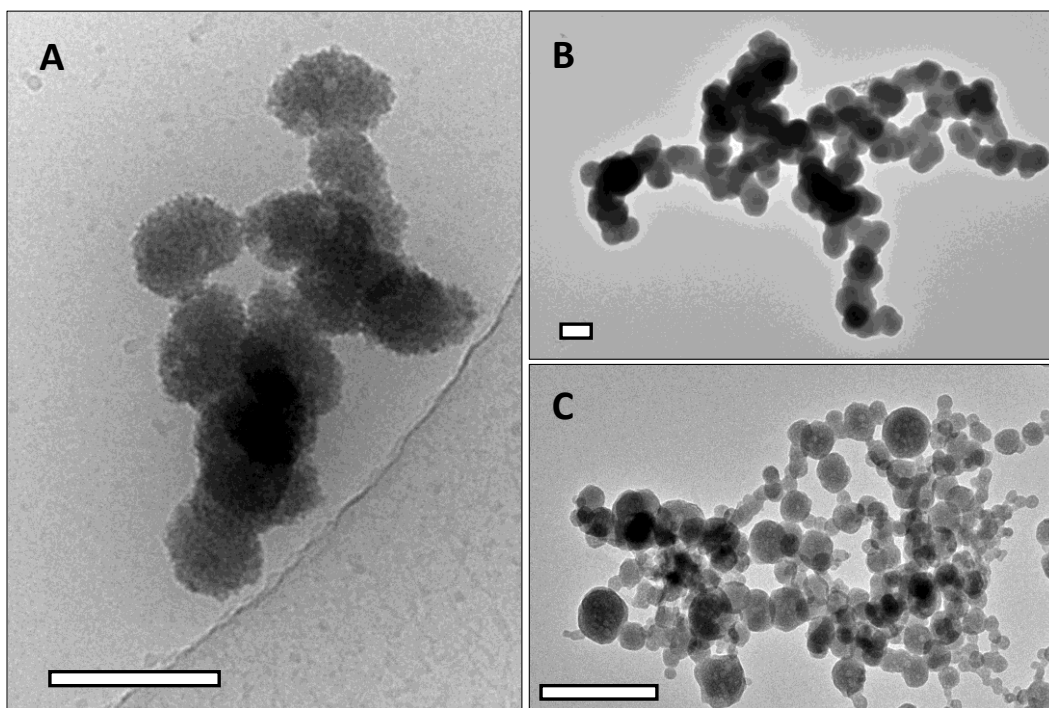


Figure 6 : Agrégats de CAP-1 observés par cryo-TEM (A) en conditions aqueuses, (B) par TEM après lyophilisation, (C) par TEM après suspension dans de l'éthanol absolu. Echelle = 200 nm.

De manière analogue, CAP-1 a été étudié par ^{31}P CPMAS en conditions aqueuses, lyophilisé et suspendu dans de l'éthanol. Les spectres correspondants sont respectivement présentés en Figure 7A, Figure 7B et Figure 7C. Les 3 signatures spectrales sont similaires, dans le sens où l'ensemble des résonances semblent être identiques. Cependant, nous observons aussi des différences d'intensités relatives entre les différentes résonances d'un spectre à l'autre que nous attribuons aux différents environnements dans lesquels ces échantillons ont été étudiés. Mise à part le spectre de CAP-1 en conditions lyophilisées, les spectres semblent témoigner que CAP-1 ne semble pas amorphe lorsqu'étudié dans un solvant, les signaux étant relativement fins. En effet, nous remarquons aussi qu'après lyophilisation, les signaux obtenus sont bien plus larges (Figure 7B). Cela démontre qu'en environnement sec, ces clusters ont tendance à s'amorphiser ce qui empêche malheureusement d'appréhender une analyse fine du nombre de sites. L'expérience par DRX en (Figure 8) démontre bien que le composé est très peu cristallisé. En particulier, la raie de diffraction vers $1,9^\circ$ est trop faible en 2θ pour renseigner un plan cristallographique. Nous supposons que ce signal traduit l'ordre d'une particule à une autre, comme c'est le cas pour la distance pore à pore dans les matériaux mésoporeux²⁶.

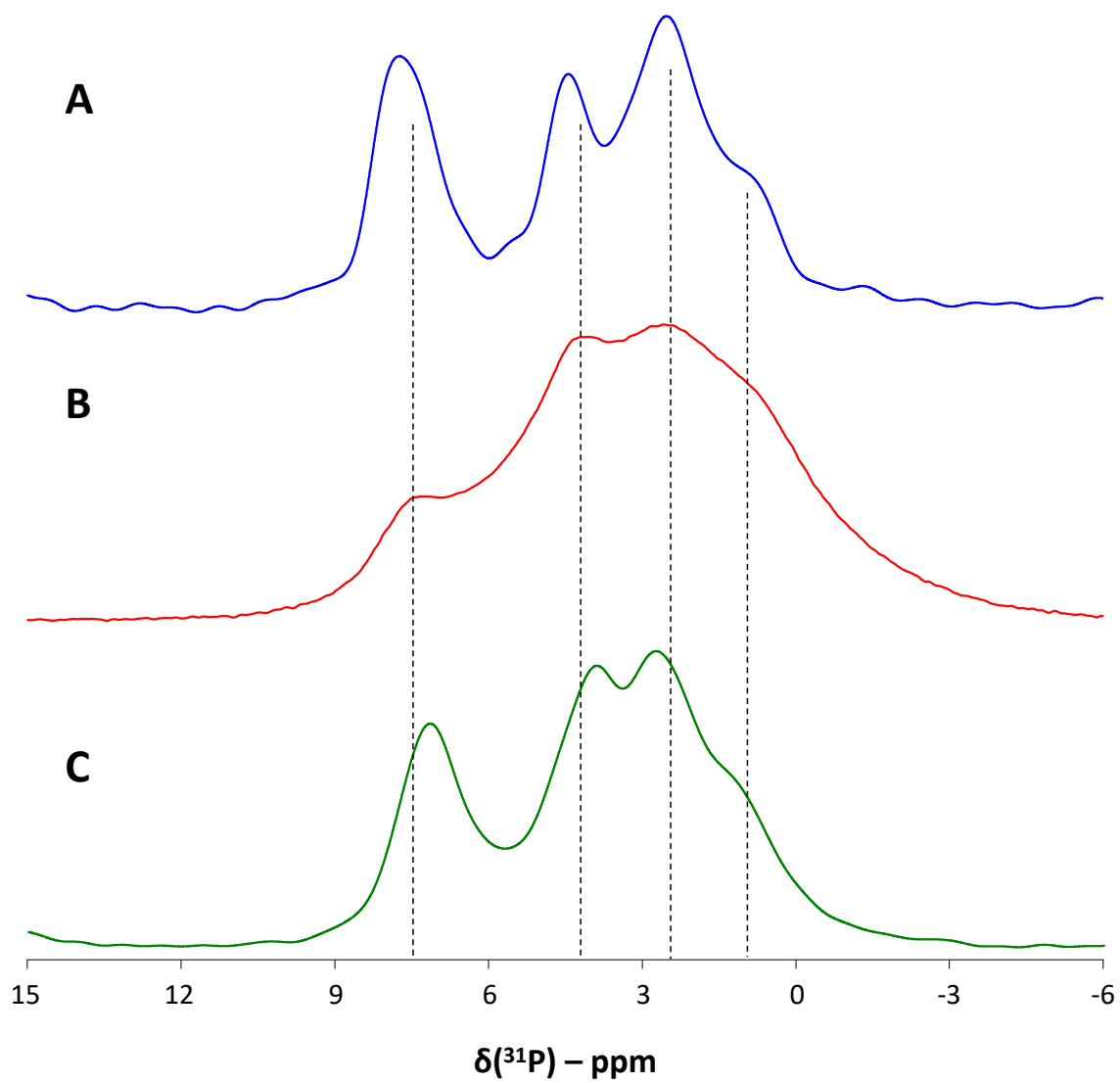


Figure 7: Spectres ^{31}P CPMAS de CAP-1 (A) en conditions aqueuses, (B) lyophilisé et (C) suspendu dans de l'éthanol absolu. $t_{\text{CP}} = 1$ ms. $\nu_{\text{ROT}} = 3$ kHz.

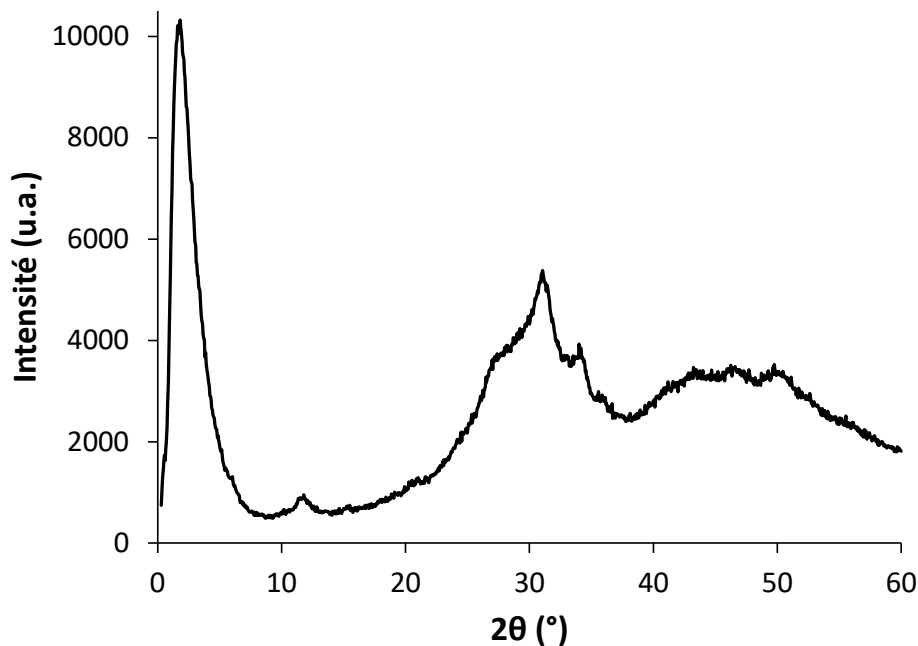


Figure 8 : Diffractogramme de CAP-1 après lyophilisation.

L'intérêt d'étudier cette espèce dans de l'éthanol absolu est de la stabiliser plusieurs jours. En effet, nous avons constaté que CAP-1 était stable pendant plus d'une semaine dans ces conditions. Cela nous a permis de réaliser une analyse structurale plus poussée par le biais de multiples séquences d'impulsion.

Premièrement, nous avons utilisé la séquence ^{31}P SQ-DQ SPC5 qui permet de réintroduire l'interaction dipolaire homonucléaire ^{31}P - ^{31}P et de corrélérer spatialement les résonances ^{31}P entre elles (Figure 9). Cette séquence permet de sonder les interactions entre plusieurs signaux d'un même noyau²⁷. L'analyse du spectre 2D permet d'identifier au moins six résonances distinctes, notées de A à F sur la Figure 9. Les tâches sur la diagonale indiquées par des carrés noirs sur la Figure 9 représentent les autocorrélations des clusters individuels les uns aux autres. Nous en déduisons que les sites A de 2 nanoparticules sont proches spatialement. L'interprétation concernant les autocorrélations des sites B, C, D et E est ambiguë, car les sites sont proches les uns des autres. En effet, les tâches hors diagonales indiquent les corrélations par paires des différents sites proches spatialement, ce qui correspondrait aux proximités spatiales dans un même cluster. Par la suite, nous supposons que ces dernières sont certainement plus intenses que les autocorrélations témoignant des proximités spatiales entre les clusters. Une analyse minutieuse permet de conclure que toutes les espèces phosphatées se voient mutuellement et font donc partie d'une seule et même phase. Les intensités des signaux générés en 2Q suggèrent que le site F est plus proche des sites D et E, que des sites B et C, le site A étant le plus éloigné de F. Suivant le même raisonnement, nous suggérons que le site A est plus proche des sites B et C que des sites D et E, le site F étant le plus éloigné. Nous tenons à préciser que cette dernière argumentation est néanmoins biaisée par la faible résolution de l'expérience impliquant des superpositions des tâches de corrélation.

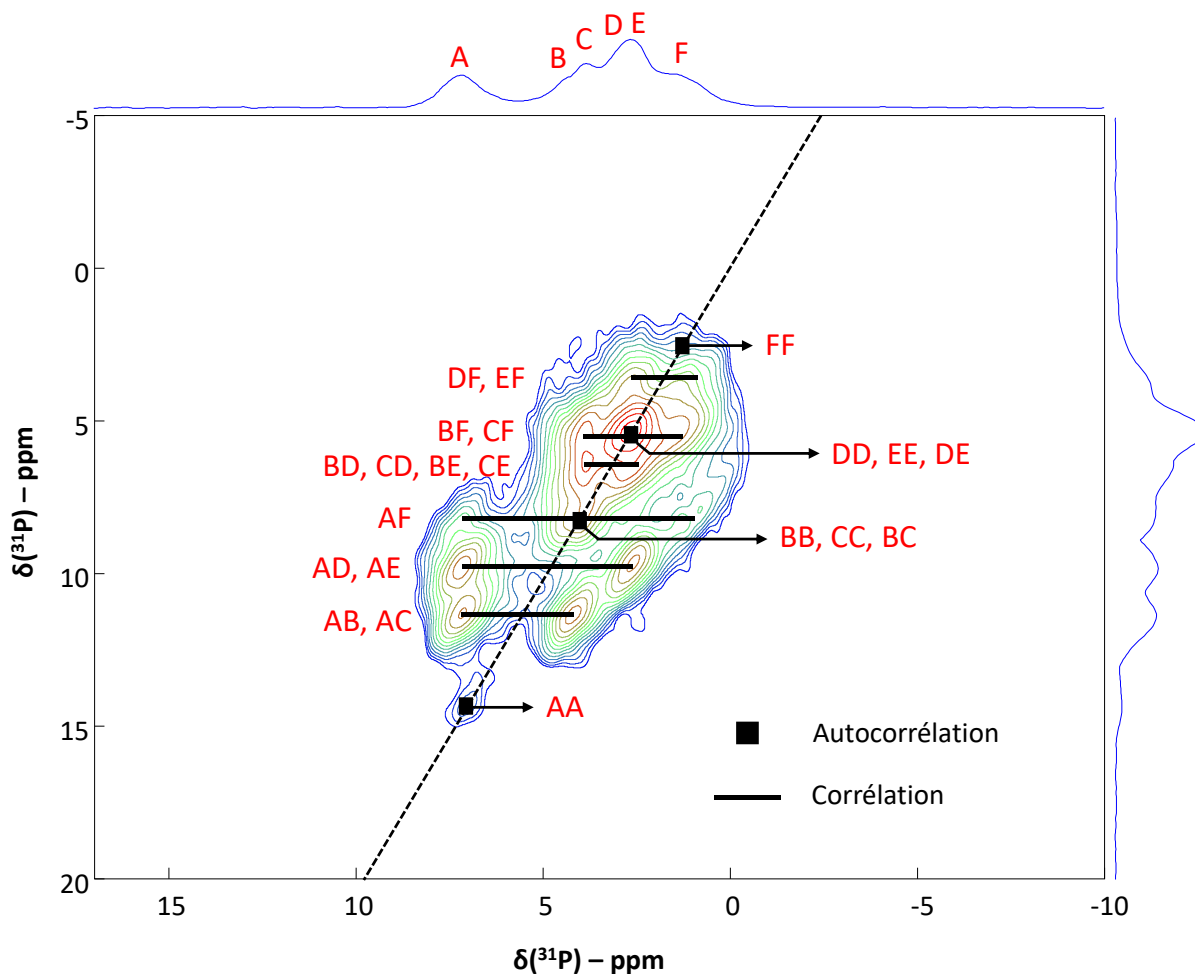


Figure 9 : Spectre 2D SPC5 ^{31}P — ^{31}P de CAP-1 dans de l'éthanol absolu. Temps de contact = 1 ms. Nombre de cycles SPC5 = 30. $v_{\text{ROT}} = 3$ kHz.

Nous avons ensuite enregistré une expérience bidimensionnelle de type Hetcor ^1H — ^{31}P (Figure 10). L'ensemble des sites phosphatés semblent corrélérer avec 2 espèces protonées différentes se situant à 5,2 ppm et entre 8 et 19 ppm. Sur la base du déplacement chimique, cela correspondrait respectivement à de l'eau structurale et des liaisons P—OH²⁸. On peut alors en déduire que les clusters de postnucléation sont bel et bien des espèces hydratées contenant des ions HPO₄²⁻. Néanmoins, cela ne veut pas nécessairement dire que l'intégralité de ces 6 sites correspondent à des ions HPO₄²⁻. En particulier, le site F semble présenter une corrélation moins intense : il est difficile de conclure à ce stade si cela est dus à sa faible intensité ou s'il s'agit d'un ion PO₄³⁻. De plus, nous remarquons l'absence de corrélation à 0 ppm indiquant qu'il n'y a pas d'ion OH⁻ apatitiques dans la structure. L'absence de corrélation avec de l'éthanol démontre que la stabilité de CAP-1 n'est pas due à de l'introduction d'éthanol structural, mais plutôt à l'absence de l'eau du solvant qui permettrait de conduire l'agrégation des particules individuelles de CAP-1. Cela permettrait d'expliquer la limitation de l'état d'agrégation provoqué par l'éthanol observée par microscopie électronique (Figure 6C).

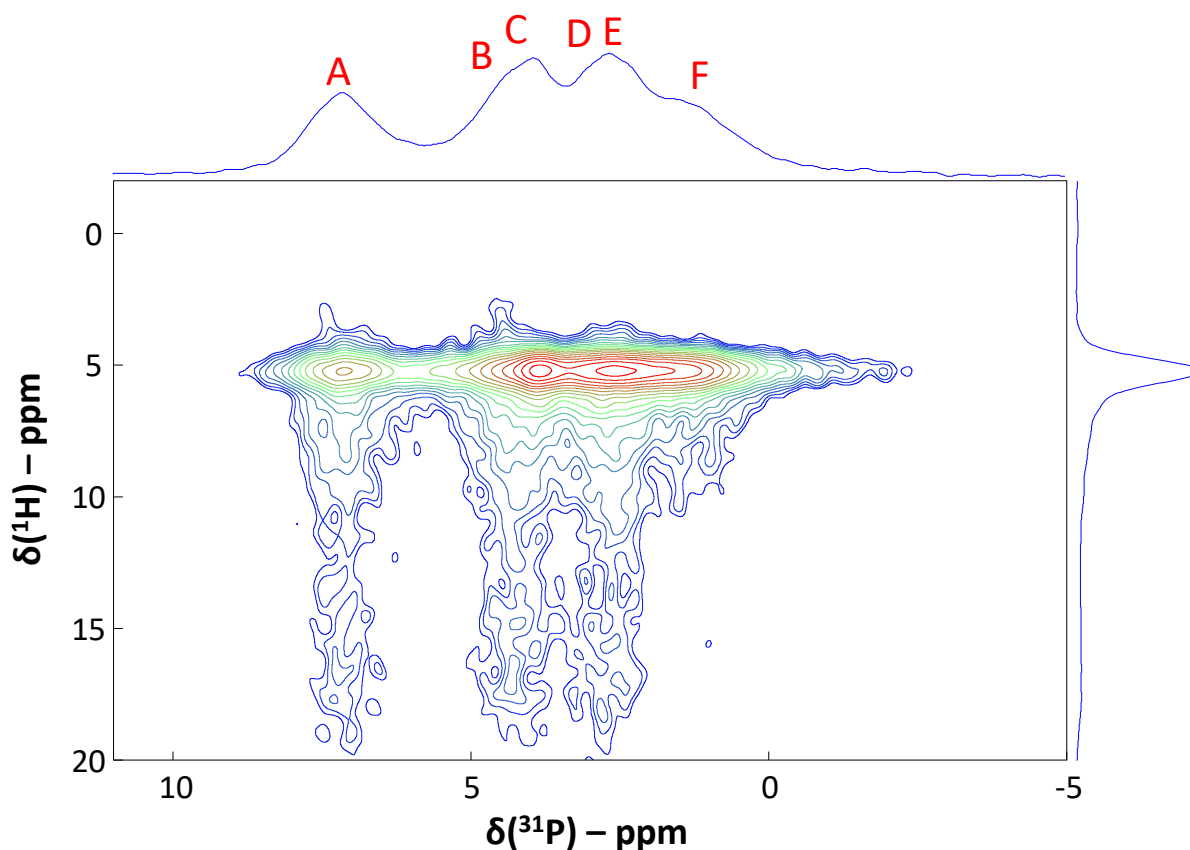


Figure 10 : Spectre 2D Hetcor ^1H — ^{31}P de CAP-1 dans de l'éthanol pur. Temps de contact = 1 ms.

En utilisant les données suggérées par l'expérience SPC5, les 6 sites cristallographiques ont été déterminés en ajustant le spectre expérimental en Figure 11 par un modèle prenant en compte le CSA. Par conséquent, nous avons déterminé les déplacements chimiques, largeurs à mi-hauteur et estimé les paramètres CSA à partir du spectre présenté en Figure 11. Les CSA ont des valeurs absolues relativement faibles mais somme toute assez comparables les unes aux autres, ce qui pourrait confirmer des états de protonation similaires. Parallèlement, nous avons fait varier le temps de contact de manière à estimer le $T_{1\rho}$ et le T_{CP} grandeurs caractéristiques du temps de relaxation dans le repère tournant et du transfert de magnétisation (Figure 12). Les valeurs de $T_{1\rho}$ et le T_{CP} déterminées sont du même ordre de grandeur d'un site phosphaté à l'autre. En particulier, T_{CP} dépend de l'interaction dipolaire ^1H — ^{31}P et donc indirectement des distances internucléaires, ainsi que de la mobilité des espèces²⁹. Ainsi, on peut conclure que les 6 signaux ont un couple interaction dipolaire / mobilité assez proches, ce qui laisse aussi penser que les 6 signaux ont le même état de protonation. L'ensemble des résultats est consigné en *Tableau 3*.

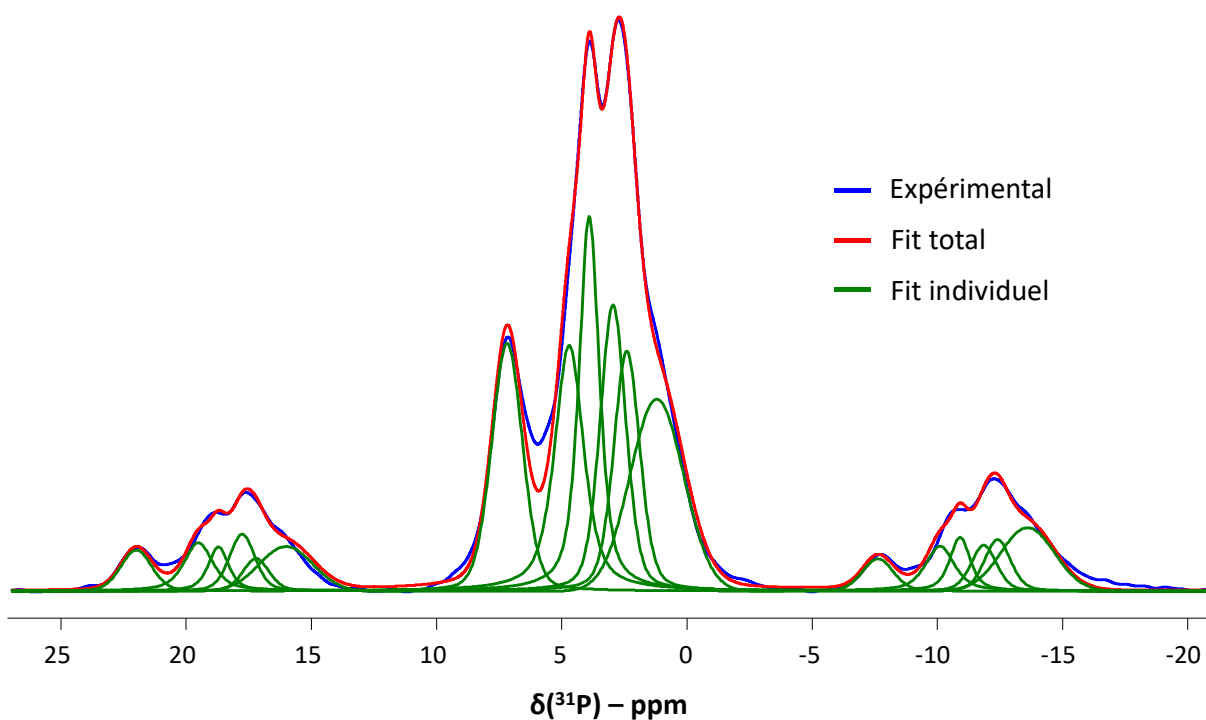


Figure 11 : Spectre ^{31}P par excitation directe de CAP-1 dans de l'éthanol absolu. $\nu_{\text{ROT}} = 3$ kHz.

Les différences d'anisotropie pourraient de ce fait s'expliquer non pas par leur état de protonation, mais par leur état d'hydratation. En effet, le temps de relaxation $T_{1\rho}$, autrement appelé temps de relaxation spin-réseau dans le repère tournant, s'intéresse typiquement à la dynamique protonique. Typiquement, la relaxation en $T_{1\rho}$ diminue avec le nombre de protons voisins ainsi qu'avec la dynamique de spins pouvant moyenner et donc diminuer l'interaction dipolaire. Dans notre cas, on peut supposer qualitativement que les sites A, B et F sont plus proches de molécules d' H_2O que les autres sites. Ceci étant dit, nous concluons que les différences en termes de déplacement chimiques, d'anisotropie de déplacement chimiques et de relaxation pourraient toutes s'expliquer par des différences d'hydratation au sein des différents signaux.

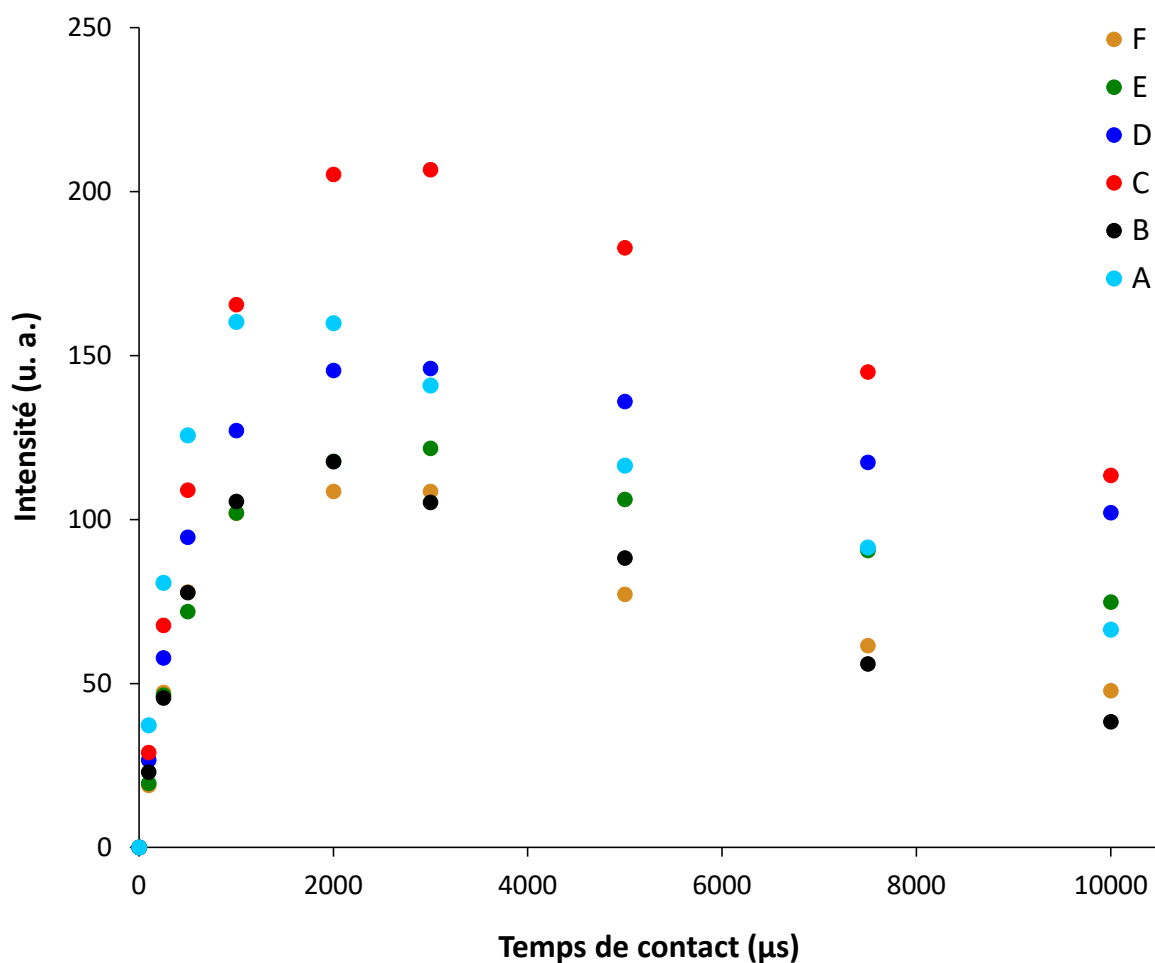


Figure 12 : Montée de polarisation de CAP-1 en suspension dans de l'éthanol absolu. $v_{\text{ROT}} = 3$ kHz.

Signal	δ_{iso} (ppm)	$L_{1/2}$ (ppm)	Δ_{CSA} (ppm)	η_{CSA}	$T_{1\rho}$ (ms)	T_{CP} (ms)
A	7.2	1.5	-19.9 ± 2	0.6 ± 0.05	9.3 ± 0.2	0.4 ± 0.02
B	4.7	1.4	-20.9 ± 2	0.9 ± 0.05	7.0 ± 0.2	0.6 ± 0.02
C	3.9	1.0	18.6 ± 2	0.6 ± 0.05	11.1 ± 0.2	0.8 ± 0.02
D	3.0	1.2	-21.4 ± 2	0.6 ± 0.05	20.7 ± 0.3	0.6 ± 0.02
E	2.4	1.2	22.7 ± 2	0.1 ± 0.05	15.4 ± 0.3	0.7 ± 0.02
F	1.2	2.1	26.7 ± 2	0.5 ± 0.05	8.7 ± 0.2	0.6 ± 0.02

Tableau 3. Grandeurs caractéristiques des signaux A à F de CAP-1 en suspension dans l'éthanol absolu.

Le même échantillon a été préparé en utilisant une solution enrichie à 10% en ^{43}Ca de manière à réaliser une expérience similaire par RMN ^{43}Ca à l'état solide. Le solide CAP-1 a été centrifugé, lavé à l'eau puis resuspendu dans de l'éthanol absolu avant d'être inséré dans un rotor de 4 mm de diamètre. Le spectre ^{43}Ca a été enregistré pendant 9 jours en utilisant une séquence de type DFS. Cette dernière permet d'augmenter la sensibilité des noyaux quadripolaires en transférant la population des transitions satellites à la transition centrale³⁰. Le spectre obtenu est présenté en Figure 13. L'absence de bande de rotations suggère que l'interaction quadripolaire est assez faible et qu'il n'y a pas de

second ordre quadripolaire. La décomposition du spectre peut être faite par deux signaux via un modèle purement gaussien-lorentzien. Ces derniers ont des déplacements chimiques autour de 17 ppm et de -12 ppm. L'intégration de ces signaux indique que les 2 résonances ont le même poids dans la structure. De plus, les différences de déplacement chimiques peuvent apporter des informations qualitatives sur les longueurs de liaison Ca—O ou sur la coordinence des ions Ca^{2+} plus faibles pour la résonance à 17 ppm³¹.

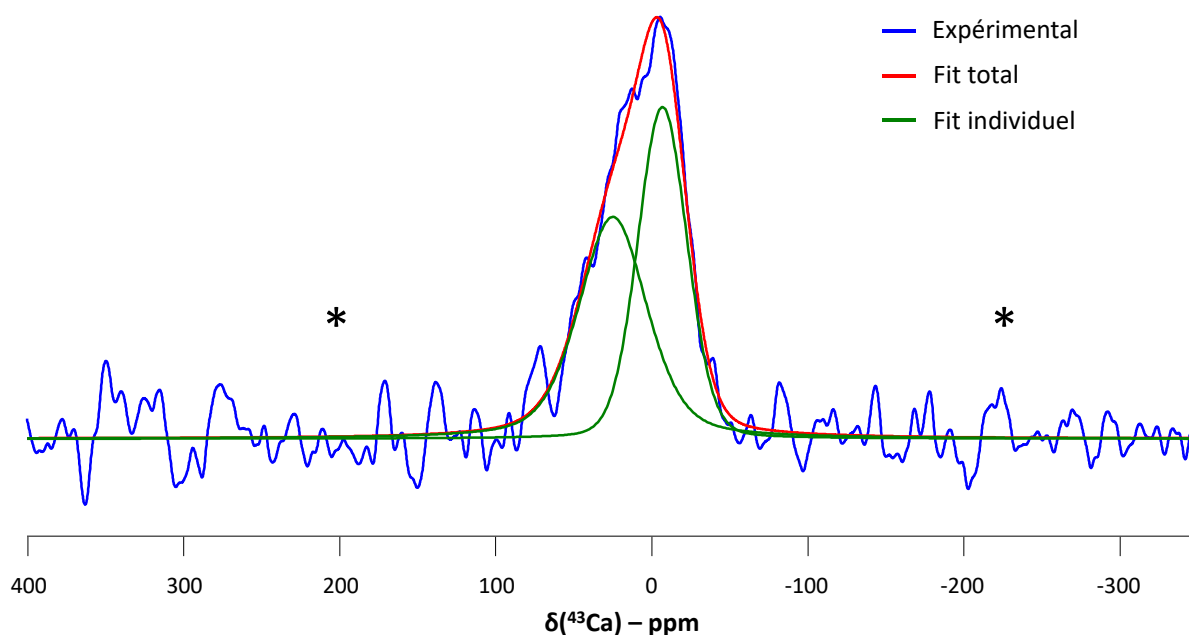


Figure 13 : Spectre ^{43}Ca par excitation directe DFS de CAP-1 dans de l'éthanol pur. Les positions des bandes de rotation, s'il y en avait, sont marquées par les étoiles. $v_{\text{ROT}} = 10$ kHz. $B_0 = 700$ MHz.

Compte tenu des difficultés à étudier CAP-1 par RMN ^{43}Ca à température ambiante, faute de sensibilité, nous l'avons étudié aussi en ^{43}Ca MAS-DNP de manière à profiter des avantages suivants :

- Le gain de sensibilité conféré par la DNP ;
- Les températures cryogéniques (100K) permettant de figer la structure et de s'assurer que cette-ci n'évoluerait pas ;
- Travailler en conditions aqueuses.

L'analyse a été réalisée en utilisant l'approche du CP haute puissance décrite dans le Chapitre V. En effet, le CP en conditions basse puissance et l'excitation directe du noyau ^{43}Ca ne permettaient pas d'obtenir de signal suffisant. Cela semble confirmer que l'approche par CP haute puissance est plus efficace pour les constantes quadripolaires C_Q faible. Le spectre ^{43}Ca CP MAS de CAP-1 est présenté en Figure 14A et semble présenter aussi deux résonances. Ces dernières ont des déplacements chimiques de -12 et 2 ppm relativement proches des déplacements chimiques déterminés plus hauts dans l'éthanol absolu. En général, la polarisation croisée ne permet pas d'obtenir des spectres quantitatifs. Cela nous permet de conclure sur le nombre de 2 sites de calcium dans CAP-1.

Par ailleurs, nous avons réalisé une Hetcor ^{43}Ca — ^1H dans l'objectif de corrélérer les sites calcium avec leurs environnements protonés voisins (Figure 14B). Nous observons notamment 2 corrélations

à des déplacements chimiques $\delta(^1\text{H})$ égaux à 5,6 ppm et entre 7 et 12 ppm que nous attribuons respectivement à de l'eau structurale et des ions HPO_4^{2-} . Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents affirmant que CAP-1 est une phase hydratée de formule $\text{Ca}_4\text{X}_4(\text{HPO}_4)_6$, où X est un cation monovalent.

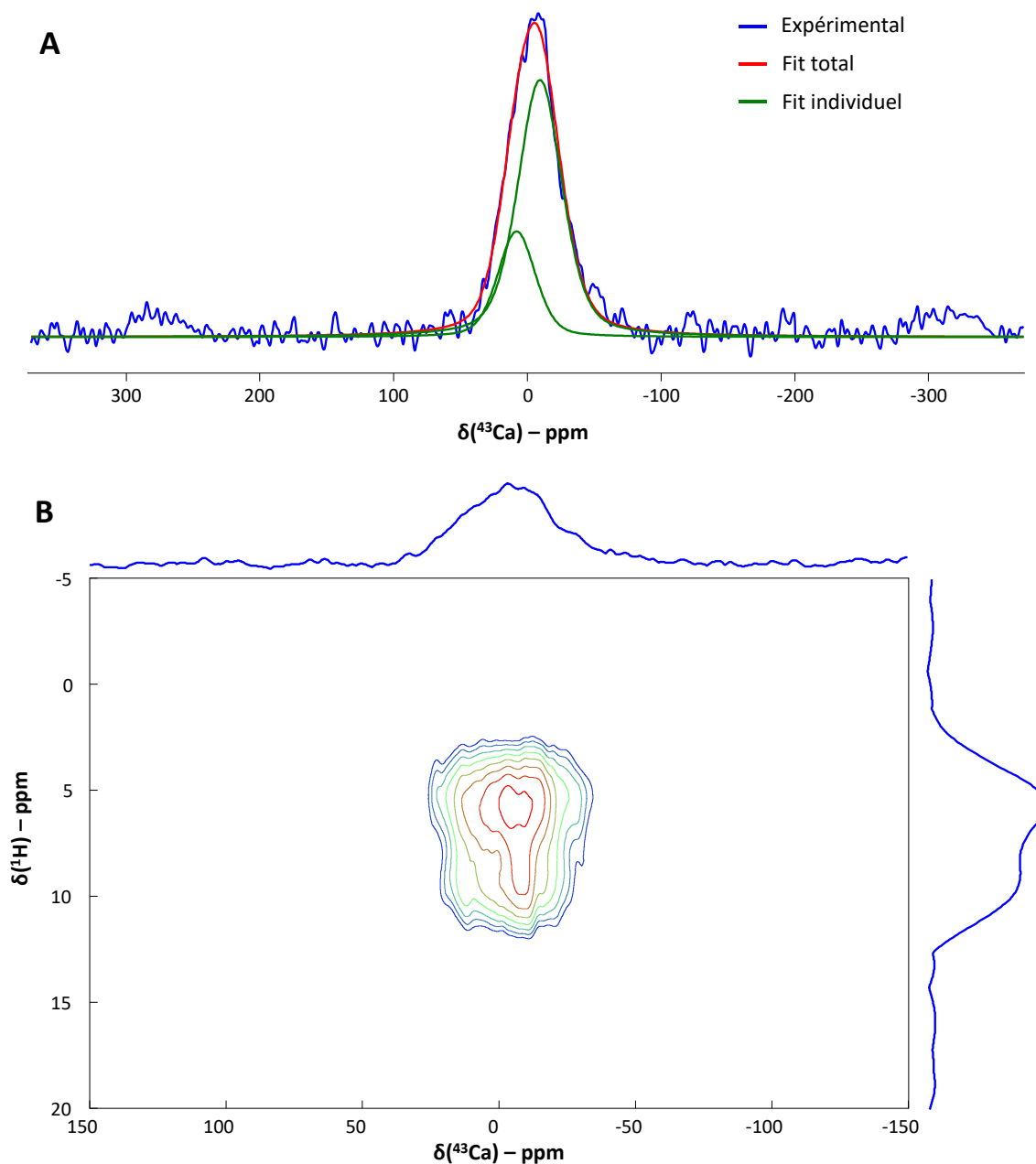


Figure 14 : (A) Spectre ^{43}Ca CPMAS et (B) LGHetcor ^1H - ^{43}Ca de CAP-1 vitrifié en conditions aqueuses. Condition de CP : haute puissance. $t_{\text{CP}} = 3$ ms. $v_{\text{ROT}} = 8$ kHz. $B_0 = 400$ MHz.

Ainsi, les analyses de CAP-1 par RMN à l'état solide des noyaux ^{31}P et ^{43}Ca , que ce soit dans de l'eau ou de l'éthanol, suggèrent la présence d'eau structurale au sein des clusters de postnucléation. Pour quantifier cette eau structurale, nous avons réalisé des analyses thermiques par ATG (Figure 15). L'expérience a été réalisée sur 2 échantillons de CAP-1 lyophilisés. Les courbes présentent une perte de masse entre 30 et 420°C. Néanmoins, les masses obtenues ne correspondent pas et nous attribuons cet effet à des différences d'eau adsorbée entre les 2 échantillons qui pourraient provenir de diverses

origines (temps de séchage, taille des particules, taille des pores entre les particules temps de conservation, hydrométrie, température...). Cette eau physisorbée est décrite dans la littérature comme s'évaporant de manière réversible entre 25 et de 100 à 200°C selon les études s'intéressant aux phosphates de calcium^{32,33}. Cependant, si l'eau adsorbée peut varier d'un échantillon à un autre, ce n'est pas le cas de l'eau structurale qui, elle, peut s'évaporer jusqu'à 400°C. Nous remarquons notamment que les parties droites des courbes TGA correspondant se confondent à partir d'une température de 135°C (Figure 15). Cela signifie que toute l'eau adsorbée est évaporée avant cette température et que le reste des variations de masse correspond à l'eau de structure. Nous quantifions cette eau structurale à environ 11% de la masse du composé.

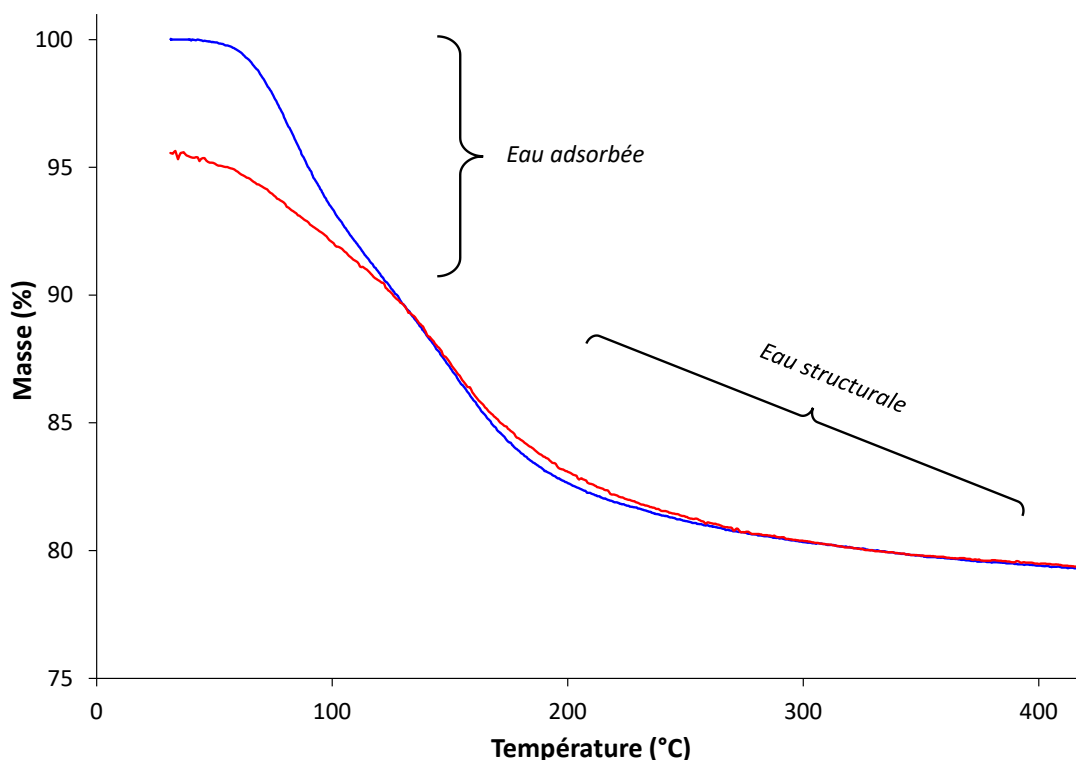


Figure 15 : Analyses thermogravimétriques de 2 échantillons lyophilisés de CAP-1 avec différenciation de l'eau adsorbée et de l'eau structurale. Les échantillons ont été chauffés sous air à 5°C/min de 30 à 500°C.

Les expériences par RMN ³¹P à l'état solide s'intéressant à CAP-1 dans l'éthanol permettent premièrement de conclure sur le nombre de 6 sites phosphates. De plus, la largeur des signaux obtenus semble suggérer une phase cristalline ce qui est en contradiction avec la littérature. L'acquisition directe en ⁴³Ca dans des conditions similaires semble indiquer deux sites calcium dans la structure. On en déduit alors que ces clusters sont issus de l'agrégation de 2 clusters de prénucléation (car composés seulement de 3 ions phosphates). L'Hetcor ¹H—³¹P détecte des ions HPO₄²⁻. Combinées à la similarité des CSA et des T_{CP} (Tableau 3), ainsi qu'avec le relargage protonique déterminé par potentiométrie pH (Figure 2B), il nous est impossible de déterminer l'éventuelle présence d'ions H₂PO₄⁻ ou PO₄³⁻. Enfin, des analyses thermiques en conditions sèches nous ont permis de quantifier un nombre de molécules d'eau structurale compris entre 5,5 et 6. Pour conclure, nous en déduisons que les clusters de postnucléation, briques individuelles de tailles nanométriques s'agréant en sphères de plusieurs dizaines de nm, sont des tetracalciumhexaphosphates hydratés Ca₄X₄(HPO₄)₆·nH₂O (X = Na⁺ ou K⁺).

Compte tenu de l'inéquivalence des sites détectés en RMN ^{43}Ca , nous supposons que nous sommes en présence de 2 types d'ions Ca^{2+} , ce qui nous permet de proposer un schéma de cette phase (Figure 16).

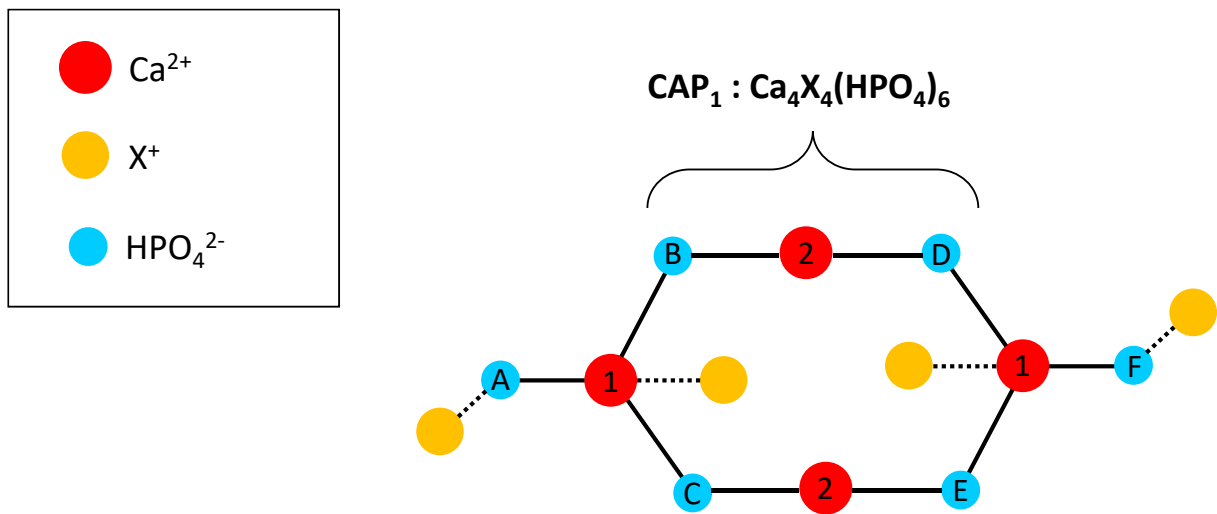


Figure 16 : Représentation schématique de CAP-1. Les molécules d'eau structurale n'ont pas été représentées. Les sites phosphates sont notés de A à F selon la Figure 9, et les sites calcium 1 et 2. X est un cation monovalent.

2) Phase transitoire / CAP-2

Après 120 minutes, les agrégats sphériques de CAP-1 évoluent ensuite en une 2^{ème} phase solide transitoire que nous appelons CAP-2 dans le cadre de ce manuscrit. L'observation en cryo-TEM montre que cette dernière se présente sous la forme de plaquettes agrégées de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de nm (Figure 17) pouvant faire penser à des plaquettes d'hydroxyapatite. Néanmoins, l'analyse de son rapport Ca/P est estimé entre 1 et 1,33, et sa signature spectrale par RMN ^{31}P à l'état solide *in situ* suggèrent qu'il s'agit bel et bien d'une espèce différente de l'hydroxyapatite.

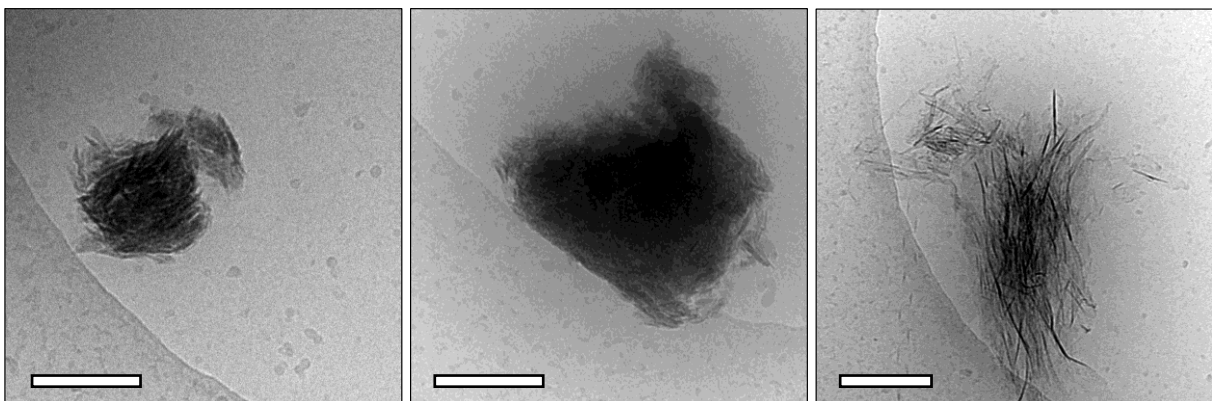


Figure 17 : Observations de CAP-2 en conditions aqueuses par cryo-TEM. Echelle = 200 nm

Tout comme pour CAP-1, nous avons tenté de stabiliser cette phase en la centrifugeant et en la plongeant dans de l'éthanol absolu. Malgré ce traitement, le signal obtenu par RMN ^{31}P à l'état solide finissait par lentement évoluer en hydroxyapatite biomimétique après 3 heures. Si CAP-1 pouvait être

stabilisé en limitant son état d'agrégation, cela ne semblait pas avoir le même effet sur CAP-2. Ainsi, les résultats qui vont suivre sont issus de l'analyse par RMN ^{31}P à l'état solide effectués sur un laps de temps de 3 heures, en enregistrant régulièrement des spectres de référence de manière à s'assurer de l'intégrité du signal au cours du temps. En particulier le spectre CPMAS obtenu (Figure 18A) a été comparé et semble correspondre au spectre RMN ^{31}P à l'état solide *in-situ* après 30 minutes d'acquisition dans la condition de précipitation 1 (Figure 4, Figure 18B). Ce spectre est relativement complexe car plusieurs résonances semblent se superposer, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un mélange de 2 phases. Cependant, les observations cryo-TEM et les résultats de l'analyse potentiométrique semblent montrer qu'il s'agit bien d'une seule phase.

L'expérience Hetcor ^1H — ^{31}P présentée en Figure 19A nous permet de distinguer 2 types de phosphates ayant des environnements protonés différents à 0 ppm et à 5 ppm ainsi qu'entre 8 et 20 ppm. Le premier environnement à 0 ppm correspondrait à des OH^- apatitiques³⁴, alors que le deuxième type de phosphates serait hydraté (corrélation à 5,1 ppm) et contiendrait des ions HPO_4^{2-} (corrélation large entre 8 et 12 ppm). Les tranches respectives ont été extraites en Figure 19B et en Figure 19C. Le signal ^{31}P correspondant aux OH^- apatitiques à un déplacement chimique de 2,9 ppm ce qui est proche de l'hydroxyapatite de synthèse ayant un déplacement chimique à 2,8 ppm. Les phosphates protonés et hydratés en Figure 19C correspondent à plusieurs sites cristallographiques car un massif complexe est observé. La comparaison de ce massif avec CAP-1 permet d'affirmer que CAP-2 est bien une phase différente.

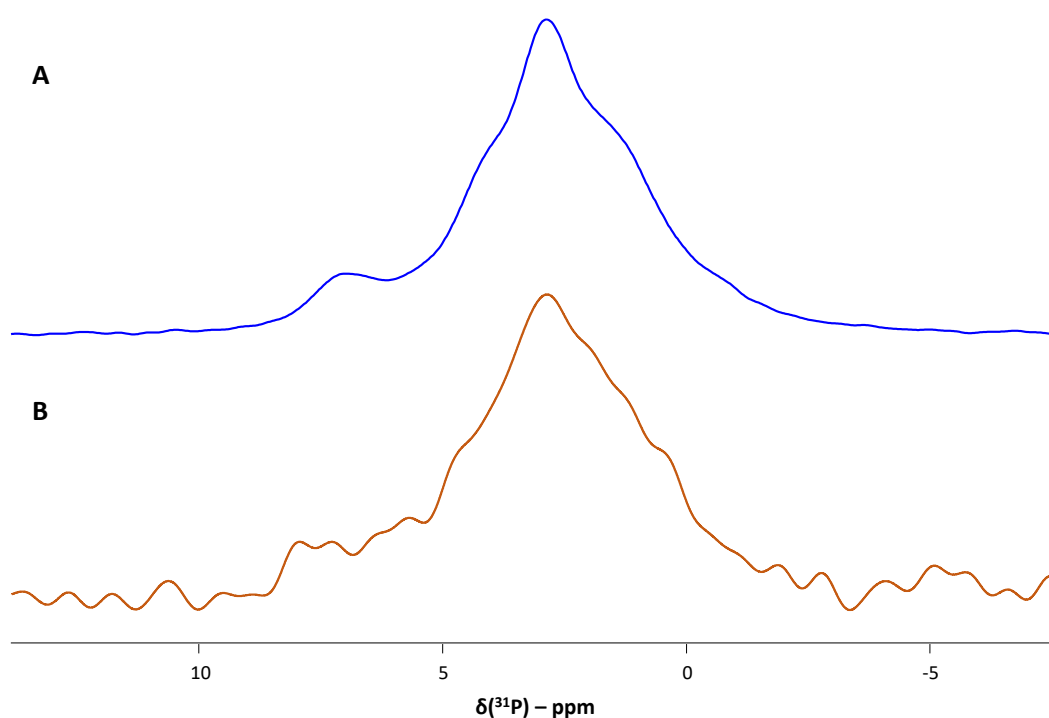


Figure 18 : Comparaison des spectres ^{31}P CPMAS de CAP-2 dans de l'éthanol pur (A) et en conditions aqueuses (B). Temps de contact = 1 ms.

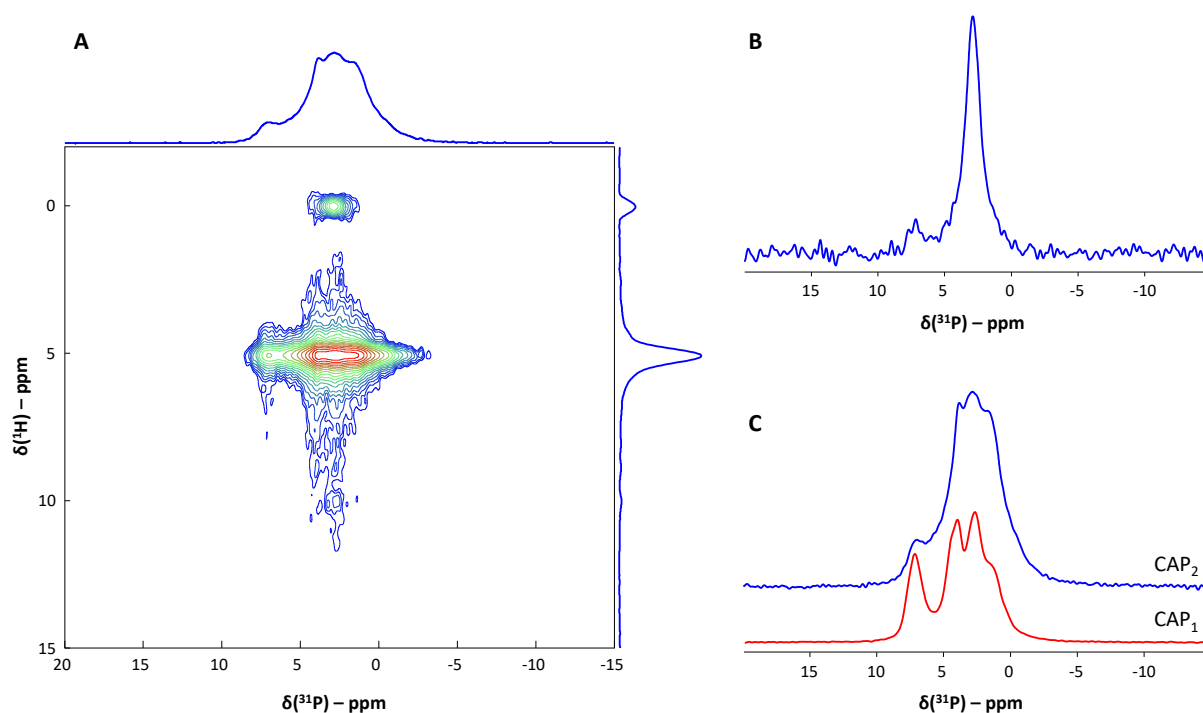


Figure 19 : (A) Spectre 2D Hetcor ^1H — ^{31}P de CAP-2 dans de l'éthanol pur. Tranches ^{31}P correspondant aux environnements protonés à (B) $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm et à (C) $\delta(^1\text{H}) = 5,1$ ppm. Comparaison avec CAP-1 (rouge). Temps de contact = 1 ms.

L'analyse du nombre de site s'est portée sur l'excitation directe ^{31}P reporté en Figure 20. Pour cela, nous avons suivi 2 stratégies d'optimisation. La première a consisté à utiliser le minimum de sites nécessaires permettant d'ajuster le spectre expérimental (Figure 20A). Cette première optimisation suppose l'implication de 4 signaux dont les proportions calculées par intégration des résonances ne collent pas avec des proportions réalistes. En particulier, le signal à gauche compte pour environ 5% du signal ce qui indique plutôt qu'il s'agit de la phase résiduelle précédente. Les 3 autres signaux n'ont pas des proportions permettant d'expliquer 6 sites et, de plus, ne suffisent pas à ajuster la tranche issue de l'Hetcor ^1H — ^{31}P (Figure 19C) correspondant aux phosphates hydratés et protonés.

La deuxième approche s'est basée sur l'argument imposant une phase résiduelle de CAP-1 dans l'ajustement, puis en utilisant le minimum de sites permettant d'obtenir un ajustement convenable (Figure 20B). Cette deuxième modélisation suppose ainsi que nous avons 25% de CAP-1 résiduel (basée sur l'intégration de sa contribution). Le reste du spectre expérimental a pu être simulé en utilisant 2 contributions à 3 et 2,5 ppm respectivement fine (1,1 ppm de largeur à mi-hauteur) et large (3,7 ppm de largeur à mi-hauteur). Leur proportion respective sont de 2:4 ce qui pourrait expliquer 6 groupements phosphatés présentant 2 types de phosphates équivalents. La première contribution fine pourrait correspondre à la phase apatitique détectée dans l'expérience Hetcor ^1H — ^{31}P (Figure 19A, Figure 19B) alors que la contribution large, en plus de CAP-1, suffirait à ajuster le spectre expérimental du massif protoné et hydraté détectée dans l'expérience Hetcor ^1H — ^{31}P (Figure 19A, Figure 19C). Dans le but de détecter d'éventuelles différences d'états de protonation, l'ajout du modèle de l'anisotropie de déplacement chimique sur ce dernier signal large permet d'ajuster les intensités des bandes de rotation du spectre expérimental. La contribution supposée apatitique ne

semble pas avoir d'anisotropie de déplacement chimique notable, ce qui est en accord avec un état de protonation nul. Ainsi, l'explication la plus simple que l'on déduit de cette analyse, est que la phase transitoire de CAP-2 a bien une population de 6 phosphates dont 2 d'entre eux sont totalement déprotonés et 4 d'entre eux sont des ions HPO_4^{2-} . Notons que la contribution des ions HPO_4^{2-} est large et fait penser à une phase amorphe ce qui est contradictoire avec la morphologie observée par cryo-TEM (Figure 17). L'hypothèse de la contribution pré-apatitique néanmoins en accord avec les aspects plaquettaires observés par cryo-TEM (Figure 17). On peut alors imaginer que la partie désordonnée pourrait faire le lien entre les différentes plaquettes observées dans les agrégats.

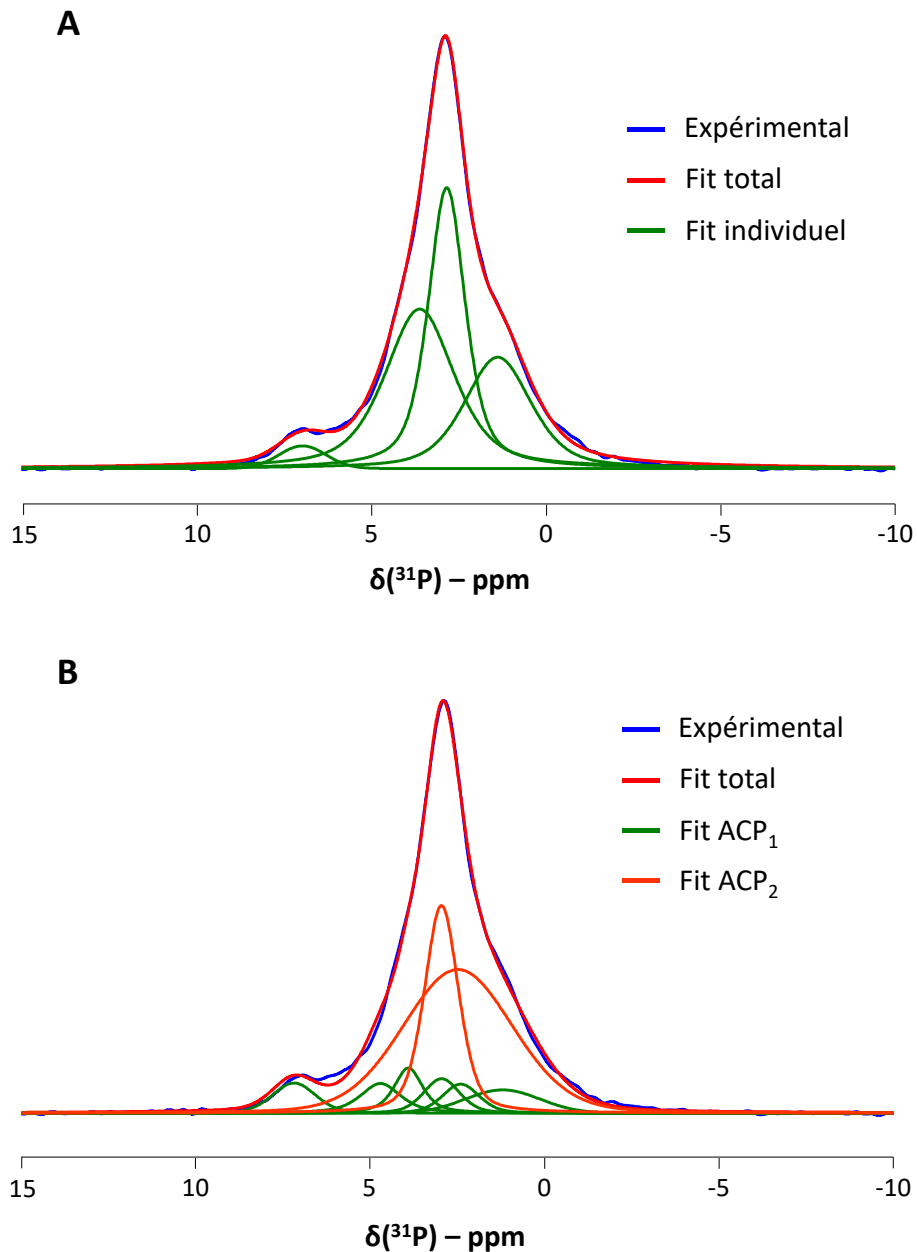


Figure 20 : Ajustements du spectre ^{31}P de CAP-2 par excitation directe. (A) Optimisation par le nombre minimum de signaux. (B) Optimisation par le nombre minimum de signaux supposant la présence résiduelle de CAP-1.

Pour aller plus loin dans l'analyse structurale de CAP-2, le composé a été lyophilisé de manière à pouvoir l'étudier dans des conditions sèches. Les spectres ^{31}P par excitation directe et 2D Hetcor ^1H — ^{31}P correspondants sont présentés en Figure 21A et en Figure 21B, respectivement. Tout comme pour CAP-1, CAP-2 semble s'amorphiser lorsqu'il ne se trouve pas en conditions aqueuses. Si l'analyse du nombre de sites correspondants s'avère problématique, l'allure générale du spectre ressemble à celle du composé disposé dans de l'éthanol pur en Figure 18A. En effet, le spectre ^{31}P par directe excitation de CAP-2 lyophilisé (Figure 21A) présente des épaulements discrets sur la gauche du massif vers 6,9 ppm ainsi que sur le centre du massif. L'Hetcor ^1H — ^{31}P en conditions lyophilisés (Figure 21B) permet de détecter deux types de phosphates : apatitiques d'une part, et hydratés et protonés d'autre part, les corrélations étant similaires à l'Hetcor ^1H — ^{31}P de CAP-2 dans de l'éthanol pur (Figure 19A).

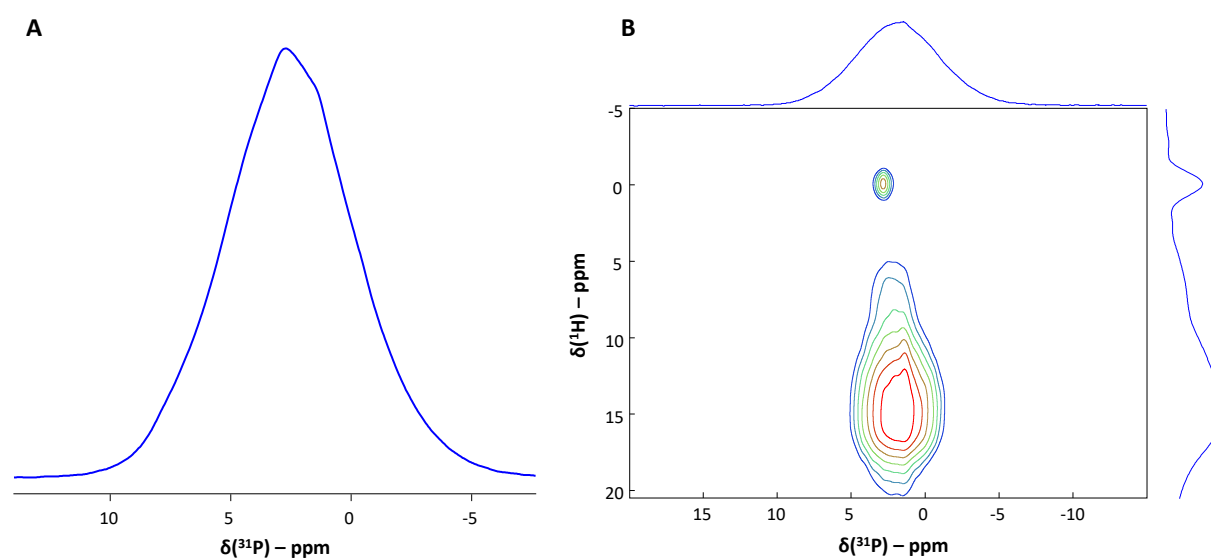


Figure 21 : (A) Spectre ^{31}P en acquisition directe et (B) spectre 2D ^1H — ^{31}P Hetcor de CAP-2 en conditions sèches. Temps de contact = 1 ms.

La condition sèche de CAP-2 nous a permis de réaliser des analyses par diffraction des rayons X. Le diffractogramme en Figure 22A indique en effet que CAP-2 est amorphe ou très peu cristallisé. Nous pouvons néanmoins noter la présence de quelques pics larges de diffraction. A titre de comparaison, nous avons consigné le diffractogramme d'une hydroxyapatite biomimétique en Figure 22B. Nous remarquons que les rares signaux de CAP-2 semblent légèrement décalés aux raies de diffraction de l'hydroxyapatite. En combinant ces résultats avec la RMN ^{31}P à l'état solide et l'analyse du rapport Ca/P, contrairement à ce qui était proposé par Habraken, nos résultats semblent démontrer une phase précurseur d'hydroxyapatite déficiente en ions calcium et comportant des phosphates partiellement protonés, plutôt qu'une phase précurseur au phosphate octocalcique, phase que nous n'avons jamais observée dans nos études par RMN ^{31}P à l'état solide. Si l'on combine les résultats de cette partie aux rapport Ca/P estimés précédemment entre 1 et 1,4, on retrouve les formules moyennes $[\text{Ca}_6(\text{HPO}_4)_4(\text{PO}_4)_2]^{2-}$, $\text{Ca}_7(\text{HPO}_4)_4(\text{PO}_4)_2$ ou $[\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_4(\text{PO}_4)_2]^{2+}$. Dans la dernière formule proposée, on pourrait imaginer que la charge positive est compensée par les ions OH^- détectés lors de l'Hetcor. Néanmoins, il convient de préciser que la phase suivante celle-ci est de l'hydroxyapatite biomimétique qui est un matériau biphasique composé d'un cœur cristallin recouvert d'une surface amorphe. Ainsi, il ne serait pas étonnant que la phase transitoire soit elle aussi composée d'un mélange

des phases discutées (ou d'autres). Par ailleurs, il n'est pas impossible que la phase pré-apatitique observée ne soit qu'un début de la cristallisation de CAP-2 en HAP. Il conviendrait d'étudier cette phase en conditions cryogéniques de manière à la décrire plus en précision.

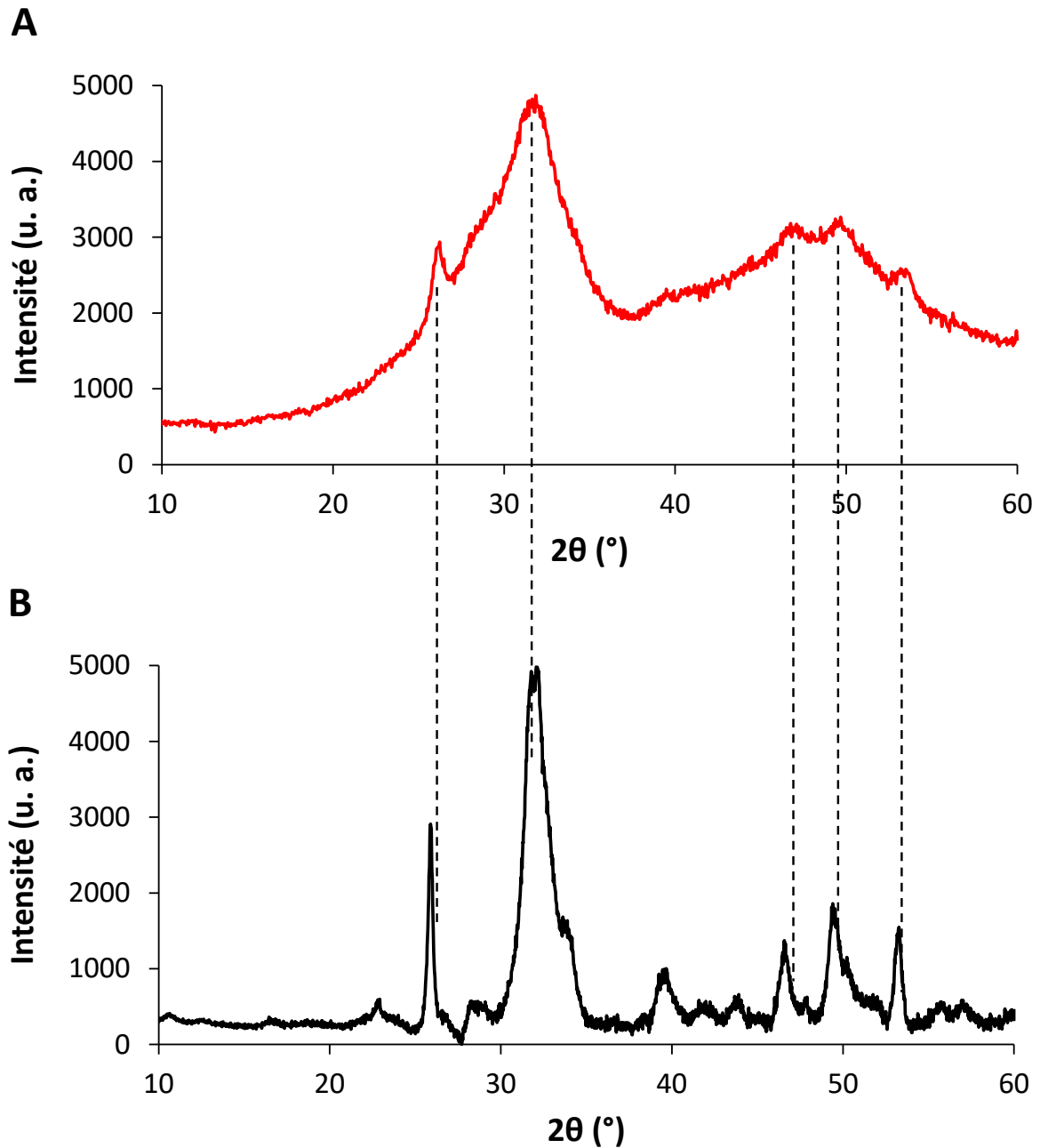


Figure 22 : Diffractogrames (A) de CAP-2 lyophilisé et (B) de l'hydroxyapatite biomimétique finale (+3 jours).

3) Hydroxyapatite biomimétique

La phase stable obtenue après 6 heures de mélange a fait l'objet d'analyses similaires, bien que les résultats exposés dans le chapitre III suggèrent que la phase finale est bien de l'hydroxyapatite

biomimétique. Nous avons premièrement observé les objets formés par cryo-TEM et TEM en prélevant des petits volumes de solution après des délais *post-mélanges* supérieurs à 6 heures, le temps pour lequel les variations des concentrations ioniques et du pH semblent être stables. Les observations par cryo-TEM (Figure 23A, B) dévoilent une majorité d'objets plaquettaires d'environ 100 nm en taille. Ces objets ressemblent fortement à des plaquettes d'hydroxyapatite déjà observées dans ce manuscrit ou dans la littérature^{35,36}. Les futures analyses ayant été portées pour la plupart sur cette phase lyophilisée, les observations de cette dernière en conditions sèches sont montrées en Figure 23C. Nous retrouvons des morphologies et tailles similaires aux clichés obtenus en conditions humides cryogéniques.

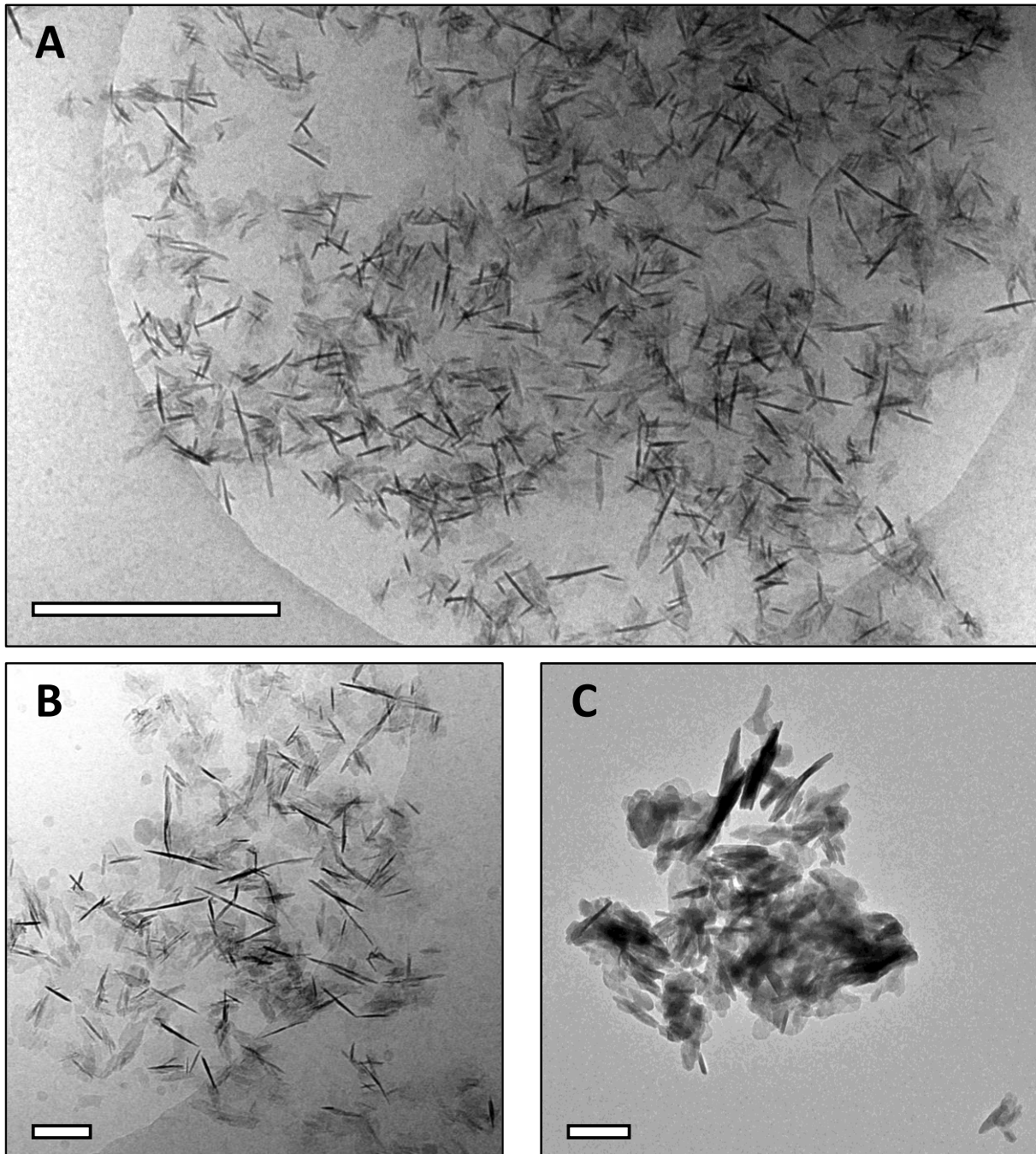


Figure 23 : Clichés d'observations d'HAP par cryo-TEM. (A) Echelle = 500 nm. (B) Echelle = 100 nm. (C) Cliché d'observation d'HAP par TEM. Echelle = 100 nm.

Nous nous sommes par la suite dirigés vers des études structurales par RMN ^{31}P à l'état solide à l'état humide (dans son eau native) et sur l'échantillon lyophilisé. Les analyses ^{31}P CPMAS sont présentées en Figure 24A. Sans surprise, le précipité analysé après 6 heures de mélange est comparable à celui observé par RMN ^{31}P *in-situ* à l'état solide en Figure 4. En particulier, nous observons 2 résonances fines à 2,9 et 1,3 ppm. La première a un déplacement très proche de celui de l'hydroxyapatite, alors que le déplacement chimique de la seconde résonance est typiquement observé pour des phases de phosphates de calcium acides telle que la brushite typiquement observée vers 1,1–1,4 ppm³⁷. Cette dernière contribution semble s'élargir et perdre en intensité au cours du temps. En parallèle, les spectres obtenus par excitation directe du noyau ^{31}P sont similaires (Figure 24B). A ce stade, nous suggérons que le signal de droite observé en conditions humides est peut-être lié à la future couche de surface amorphe en conditions sèches.

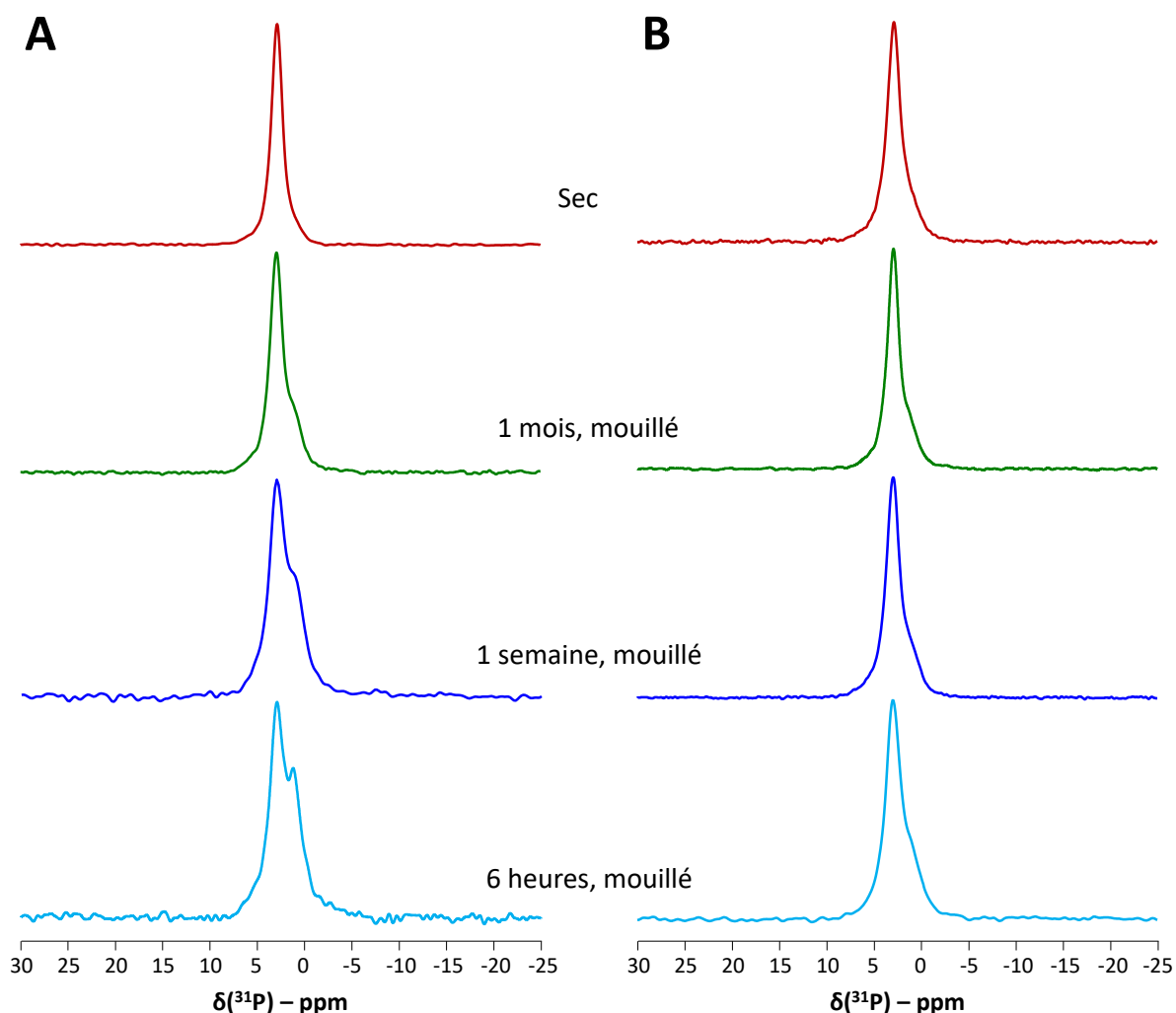


Figure 24 : (A) Spectres ^{31}P CPMAS et (B) ^{31}P par excitation directe d'HAP en suspensions aqueuses analysés à différents temps de mélange et en conditions sèches, lyophilisées. Spectre bleu clair = 6h, bleu foncé = 1 semaine, vert = 1 mois, rouge = lyophilisé après 3 jours. Temps de contact = 10 ms.

De manière analogue, nous avons enregistré des expériences Hetcor ^1H — ^{31}P sur un échantillon mouillé et un échantillon sec respectivement consignés en Figure 25A et Figure 25B. Des corrélations similaires sont observées dans les 2 conditions. En particulier, le signal à 2,9 ppm dans la dimension

^{31}P est en corrélation avec le signal à 0 ppm dans la dimension indirecte ^1H . Ce dernier correspond aux OH^- apatitiques de l'hydroxyapatite ce qui démontre que le minéral final obtenu est bien de l'hydroxyapatite. Additionnellement, les 2 conditions présentent une corrélation entre 4,5 et 12 ppm qui correspondrait à de l'eau de structure et des ions HPO_4^{2-} sur la base de leur déplacement chimique. Cette contribution démontre ainsi le caractère hydraté de cette phase additionnelle. Celui-ci est d'autant plus marqué quand le minéral est en conditions aqueuses. La présence d'ions HPO_4^{2-} rappelle l'hypothèse de la couche de surface amorphe.

Les tranches ^{31}P extraites des 2 expériences bidimensionnelles au déplacement chimique de l'eau ont été comparées à la tranche extraite correspondant à la phase apatitique (Figure 25C). Au travers de cette comparaison, nous remarquons que les largeurs totales du signal ^{31}P obtenu dans les 2 conditions d'analyse sont similaires. En conditions humides, le signal est bien défini et consiste en un minimum de 2 résonances bien distinctes à 3,2 et 1,0 ppm se superposant à une large contribution (5,8 ppm de largeur à mi-hauteur) à 2,6 ppm. Notons que cette phase ne correspond pas au déplacement chimique du signal des PO_4^{3-} apatitiques à 2,9 ppm (Figure 25C). A notre connaissance, aucune phase de phosphate de calcium connue ne présente ces caractéristiques ce qui ne permet pas d'identifier cette phase. Habraken *et al.* ont proposé que le phosphate octocalcique, ou au moins une phase précurseur de l'OCP pouvait être à l'origine de la formation d'hydroxyapatite¹⁵. Bien que la phase partage un signal à 3,2 ppm avec l'OCP³⁸, les autres signaux ne correspondent pas. De plus, aucune trace de l'OCP n'a été détectée lors de nos analyses, c'est pourquoi nous ne pensons pas que cette phase soit de l'OCP résiduel. Par ailleurs, Eicher *et al.* ont aussi observé cette phase résolue dans des hydroxyapatites nanocristallines et l'ont identifié comme une phase proche, mais pas identique à l'OCP²⁵.

En conditions sèches le signal semble amorphe ce qui induit un manque de résolution ne permettant pas de retrouver ces 3 résonances, néanmoins la forme globale du massif rappelle celle obtenue en conditions humides. Cette comparaison ne permet pas de conclure mais suggère tout de même que la phase additionnelle détectée en conditions hydratées correspond à la phase amorphe de surface détectée en conditions sèches. Nous pouvons maintenant interpréter la diminution observée de la contribution de surface observé en Figure 24B comme une maturation de la couche amorphe de surface³⁹, comme proposé par Eichert *et al.*²⁵.

Un argument supplémentaire en faveur de cette proposition a été apportée par une expérience de CP SPINDIFFUSION ^{31}P — ^{31}P . Cette technique permet d'étudier les interactions à grande portée entre différents signaux d'un noyau identique. En particulier, cette technique est relayée par la diffusion de spin ^1H , et les corrélations obtenues signifient alors que 2 groupements différents soient en corrélation avec la même source de protons. L'expérience a été optimisée pour notre système et les résultats (Figure 26B) indiquent en effet une corrélation hors diagonale entre les 2 signaux obtenus en conditions aqueuses. Cette corrélation n'est pas observée à faible temps de recouplage (Figure 26A), qui représente une expérience contrôle en l'absence de corrélation. Cela signifie que la phase d'hydroxyapatite est à proximité des protons contenus dans la phase additionnelle et renforce l'idée qu'il s'agit bien de la phase humide de la couche de surface amorphe.

Si à ce jour nous ne pouvons pas conclure sur la nature de cette phase se transformant en couche de surface, nos analyses précisent qu'elle est probablement déjà en contact avec l'hydroxyapatite avant de s'amorphiser avec le temps. Le signal à 1,3 ppm corrélant avec de l'eau et

des ions HPO_4^{2-} suggère une phase de type brushite, alors que le signal à 3,2 ppm rappelle un signal de l'OCP. Cependant ces phases n'ont pas été observées au cours du mécanisme de précipitation. Il pourrait s'agir d'un produit issu de la transformation de la phase transitoire en hydroxyapatite, mais aucune preuve ne nous permet d'établir cette assertion avec certitude. Eventuellement, des mesures par DRX en conditions hydratées permettraient de compléter ces résultats. Malheureusement, cela n'a pas été réalisé par manque de temps.

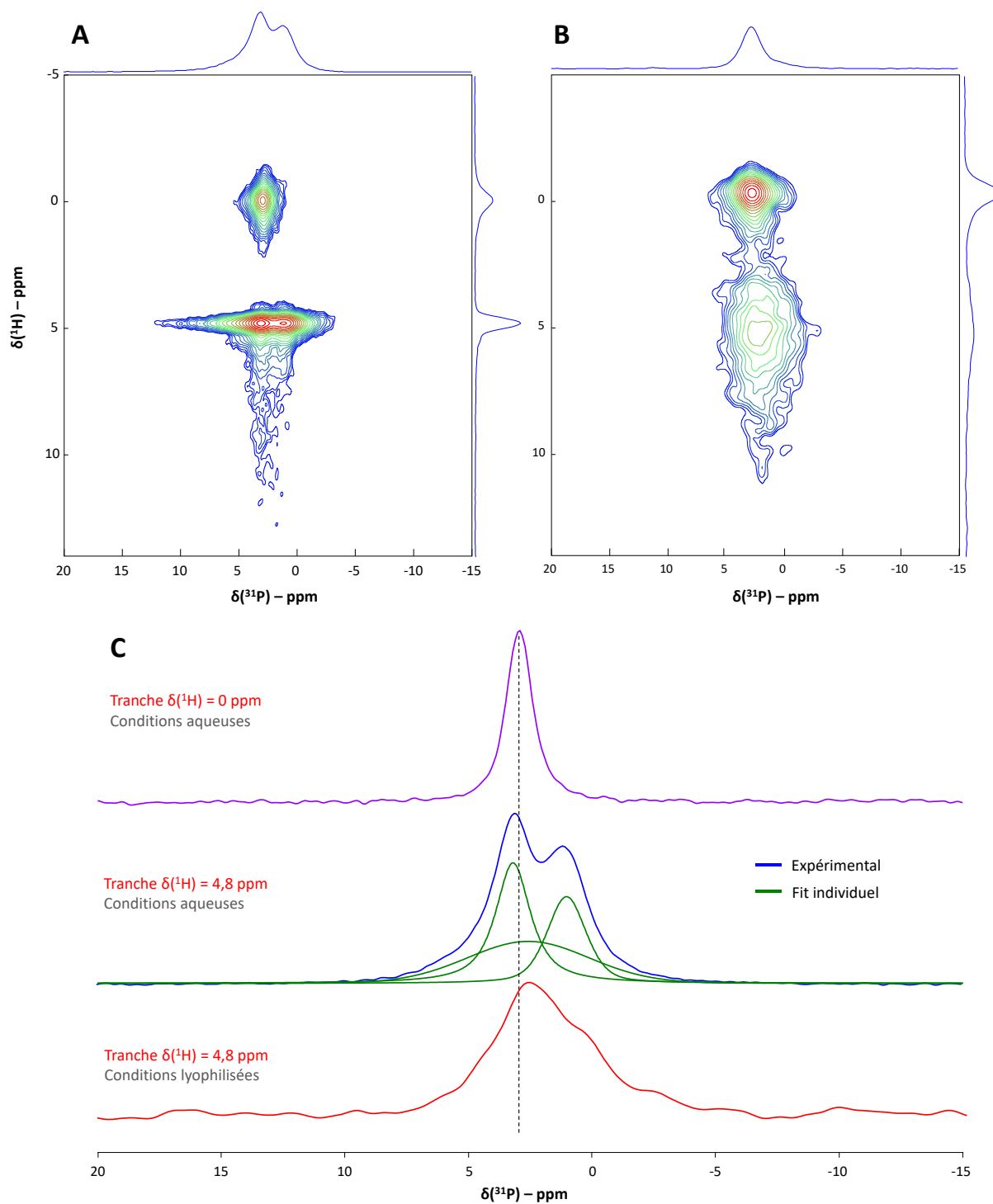


Figure 25 : Spectres 2D ^1H — ^{31}P Hetcor d'HAP en conditions (A) humides et (B) sèches après 2 jours de maturation. (C) Tranches ^{31}P extraites à : de bas en haut $\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm (violet, haut), $\delta(^1\text{H}) = 4,8$ ppm en conditions humides (bleu, milieu) et $\delta(^1\text{H}) = 4,8$ ppm en conditions humides sèches (rouge, bas). Temps de contact = 1 ms.

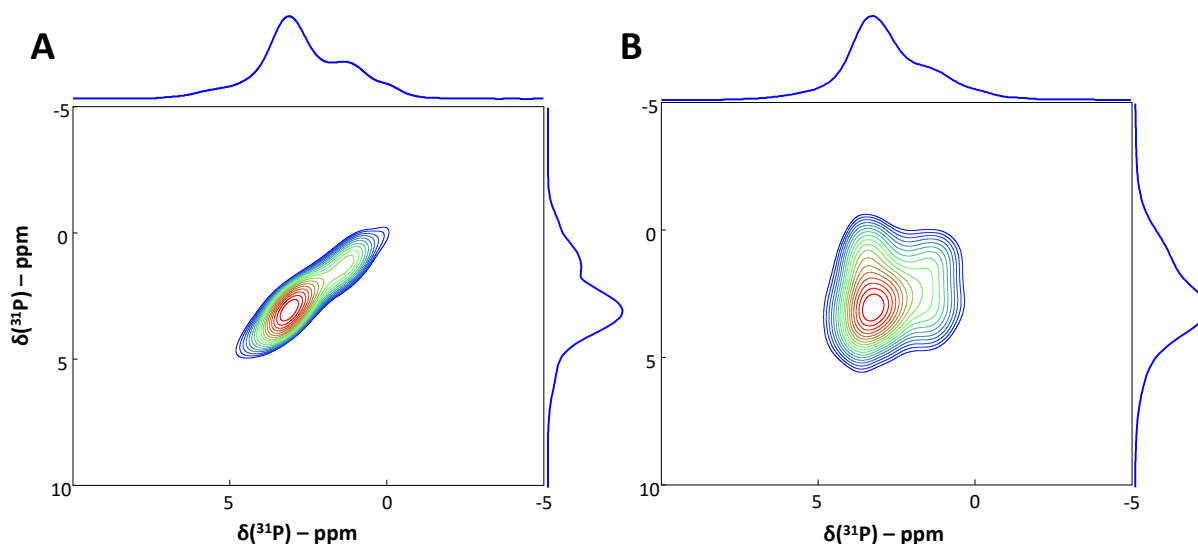


Figure 26 : Spectres 2D ^{31}P — ^{31}P CP SPINDIFFUSION d’HAP en conditions humides avec (A) 222 μs de temps de mélange et (B) 222 ms de temps de mélange. Temps de contact = 1 ms.

4) Présence de sodium : contre-ion ou substitutions cationiques ?

Dans la dernière partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la potentielle implication d’un autre cation, ici le sodium, dans le mécanisme de nucléation non-classique de l’hydroxyapatite. En effet, les résultats proposés dans ce chapitre s’accordent avec les rares études de la littérature sur la nature négativement chargée des charpentes de phosphates de calcium dans les différentes phases transitoires solides. En particulier, nous proposons que les charpentes de phosphates de calcium de CAP-1 et CAP-2 ont les formules chimiques respectives $[\text{Ca}_4(\text{HPO}_4)_6]^{4-}$ et $[\text{Ca}_{6+n}(\text{HPO}_4)_4(\text{PO}_4)_2]^{-2+2n}$ (où $0 \leq n \leq 2$). Cela suggère que la présence de cations monovalents tels que Na^+ ou K^+ devrait être intégrée dans ces charpentes de manière à assurer l’électroneutralité de ces phases solides. Les objectifs de ce chapitre sont ainsi de confirmer la présence de ces cations dans les structures solides transitoires et de discuter leur rôle dans la substitution des ions Ca^{2+} .

Pour ce faire, nous avons légèrement modifié la condition de précipitation 1. En particulier, nous avons remplacé KCl par NaCl de manière à simplifier l’étude, le seul cation autre que Ca^{2+} étant désormais Na^+ . Cela n’a pas eu d’effet significatif sur la cinétique de précipitation. Cela nous a permis de réaliser une expérience de RMN ^{23}Na en solution *in-situ*. La RMN ^{23}Na s’avère dans ce cas très pratique, car ce noyau est très sensible, de par son abondance naturelle de 100%, son rapport gyromagnétique intermédiaire proche du ^{13}C et son temps de relaxation longitudinal très faible.

La variation de concentration en Na^+ déduite de l’intégration des résonance ^{23}Na au cours du temps du temps est présentée en Figure 27A. La concentration en Na^+ semble augmenter au cours du temps et nous n’observons pas de variation significative de la largeur des signaux ou de leur déplacement chimique (Figure 27B). L’augmentation de la concentration laisse supposer qu’au cours du temps les ions Na^+ initialement présents dans la structure ont tendance à retourner en solution. Cela est cohérent avec le modèle présenté dans ce manuscrit dans lequel :

- Les ions Na^+ servant à contrebalancer la charge des PNC seraient soluble donc non détectés par RMN ^{23}Na en solution ;
- Après nucléation, 4 ions Na^+ seraient intégrés dans la structure de chaque cluster de postnucléation CAP-1, se traduisant par une baisse marquée de la concentration en ions Na^+ solubles ;
- Le passage à la phase transitoire, une phase moins chargée, s'accompagnerait du relargage de 2 ions Na^+ par CAP-2 auquel cas nous observerions une réaugmentation partielle de la concentration en ions Na^+ solubles ;
- A mesure que CAP-2 intègre des ions Ca^{2+} dans la structure, des ions Na^+ sont relargués en solution se traduisant encore une fois par une augmentation de la concentration en ions Na^+ solubles jusqu'à la concentration initiale (si aucune substitution cationique n'a lieu) ;
- La cristallisation de CAP-2 en HAP n'impliquerait pas d'ions Na^+ donc pas de variation de la concentration en ions Na^+ solubles.

Cependant, nous n'observons pas la première décroissance correspondant à la nucléation, ce qui rend discutable l'interprétation de cette expérience. En effet, il se peut que la nucléation ait eut lieu pendant l'intervalle de temps correspondant à la préparation de l'échantillon et du spectromètre consistant en :

- L'initiation du mélange dans un eppendorf ;
- Mélange au vortex pendant 5 minutes ;
- Insertion du mélange dans un tube RMN et insertion du tube dans le spectromètre ;
- Etapes de lock et de shimming du spectromètre ;
- Lancement de la première acquisition (5 minutes).

Le laps de temps entre le mélange de la solution et l'acquisition du premier point s'étend donc à une quinzaine de minutes, ce qui est comparable au temps de précipitation de la condition 1. De plus, la concentration initiale en Na^+ est difficilement calculable car elle dépend de la quantité de NaOH utilisée pour ajuster le pH de la solution. De plus, l'absence d'agitation dans le spectromètre rend la cinétique de précipitation imprévisible, pouvant parfois être observée avant ou bien après (jusqu'à 4 heures de « retard » pour cette condition de précipitation) ce qu'on attendrait sous agitation mécanique. Compte tenu de ces cinétiques de précipitation imprévisibles, nous reportons les événements concernant la nucléation, la formation de CAP-2 et d'HAP sur la Figure 27A. Ainsi, ces incertitudes ne permettent pas d'être unanime sur les résultats de cette expérience, les variations de concentration pouvant être faussés par une dérive du champ magnétique pendant la nuit. Il faudrait réitérer l'expérience sur une condition de précipitation précipitant plus lentement afin de pouvoir affirmer avec certitude nos résultats.

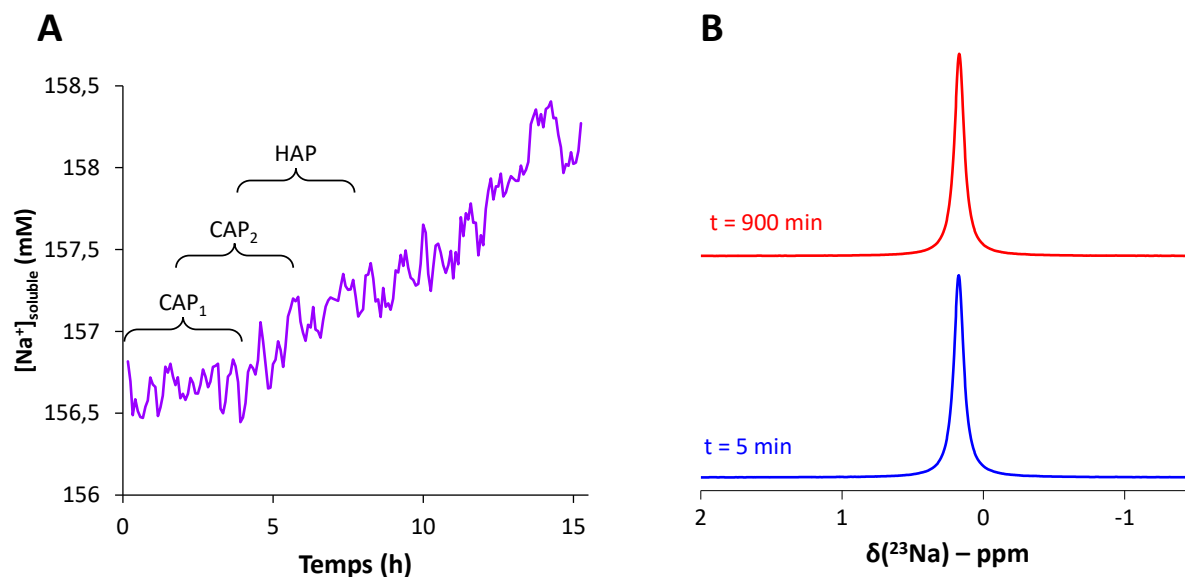


Figure 27 : (A) Détermination de la concentration en ions Na^+ en solution au cours du temps par suivi spectroscopique de la précipitation par RMN ^{23}Na en solution. Cinétiques de précipitation. Résolution temporelle = 5 min. (B) Comparaison des spectres ^{23}Na après 5 minutes (bleu, bas) et 900 minutes (rouge, haut).

Dans l'objectif de valider ou d'infirmer ce modèle, nous avons réalisé des expériences de RMN ^{23}Na à l'état solide, l'idée étant d'étudier un échantillon solide stable. Pour cela, nous l'avons concentré par centrifugation puis suspendu dans de l'éthanol absolu avant de transférer le tout dans un rotor de 4 mm. Le spectre obtenu par excitation directe ^{23}Na est présenté en Figure 28A et se trouve sous la forme d'un large massif de 33 ppm de largeur à mi-hauteur se situant à -11 ppm. Si la présence d'ions Na^+ dans la structure est ainsi prouvée, le faible SNR ne nous permet pas de dénombrer plusieurs sites ou d'estimer sa constante quadripolaire. En particulier, la largeur du signal nous informe sur la distribution d'environnement chimique autour des ions Na^+ , suggérant une distribution de déplacement chimique et de constante quadripolaire. Le spectre en conditions sèches (échantillon lyophilisé) est présenté en Figure 28B.

Dans ce cas, le solide a été lavé avec une solution aqueuse de NaCl 150 mM avant d'être lyophilisé, l'objectif étant de conserver un maximum d'ions Na^+ dans la structure tout en éliminant d'éventuelle phase non désirée reprécipitant lors de l'étape de lyophilisation. Le signal obtenu est relativement similaire en termes de déplacement chimique (-9 ppm) et de largeur (29 ppm à mi-hauteur) et confirme une nouvelle fois la présence d'ions Na^+ dans la structure.

La proximité de ces derniers avec les groupements phosphates de CAP-1 a été démontré par une expérience ^{23}Na REDOR $\{^{31}P\}$. Sans rentrer dans les détails, cette expérience permet de mettre en évidence l'interaction dipolaire hétéronucléaire $^{23}Na-^{31}P$, laquelle dépend de la distance internucléaire entre ces 2 spins⁴⁰. L'expérience consiste à comparer des spectres ^{23}Na obtenus avec et sans irradiation ^{31}P de manière contrôlée. Le temps d'irradiation est varié et le spectre obtenu sous irradiation se voit décroître si le signal observé est bien à proximité spatiale des espèces phosphatées, ici les groupements phosphates de CAP-1, comme montré en Figure 29A. Enfin, il est possible de calculer les distances entre les ions Na^+ et les groupements phosphates en modélisant le rapport de la différence des intensités des signaux avec et sans irradiation sur l'intensité du signal obtenu sans

irradiation en fonction du temps de recouplage. Néanmoins, si cela peut aisément être obtenu pour des paires d'ions, le système en présence est bien plus complexe et nécessiterait des modélisations poussées que nous n'avons pas eu le temps de mettre en place.

Notons toutefois que le profil de déphasage obtenu en Figure 29B est comparable à d'autres études similaires^{41,42}. Néanmoins, ces études portaient sur la substitution d'ions Ca^{2+} par des ions Na^+ et rappellent qu'il est légitime de poser la question de l'origine des ions Na^+ dans la structure, à savoir s'il s'agit bien de contre-ions ou alors d'une substitution des ions Ca^{2+} par les ions Na^+ . A ce stade, il n'est pas clair si l'origine des ions Na^+ détectée provient de contre-ions ou de substitutions ioniques des ions Ca^{2+} . En effet, le faible SNR pourrait expliquer le faible nombre de sodium impliqués dans des substitutions ioniques, mais pourrait aussi être justifié par la largeur des signaux. Ceci étant dit, il apparaît peu favorable que ce dernier cas soit d'actualité car la substitution d'ions Ca^{2+} aurait certainement un effet diminutif sur le nombre de groupements phosphates dans la structure que nous n'avons pas observé. Des expériences de RMN ^{43}Ca à l'état solide dans les mêmes conditions pourraient apporter des réponses. De même, des analyses élémentaires par ICP-OES permettraient de calculer les proportions relatives de Na, Ca et P dans les phases solides. Par manque de temps, ces dernières expériences n'ont pas pu être réalisées.

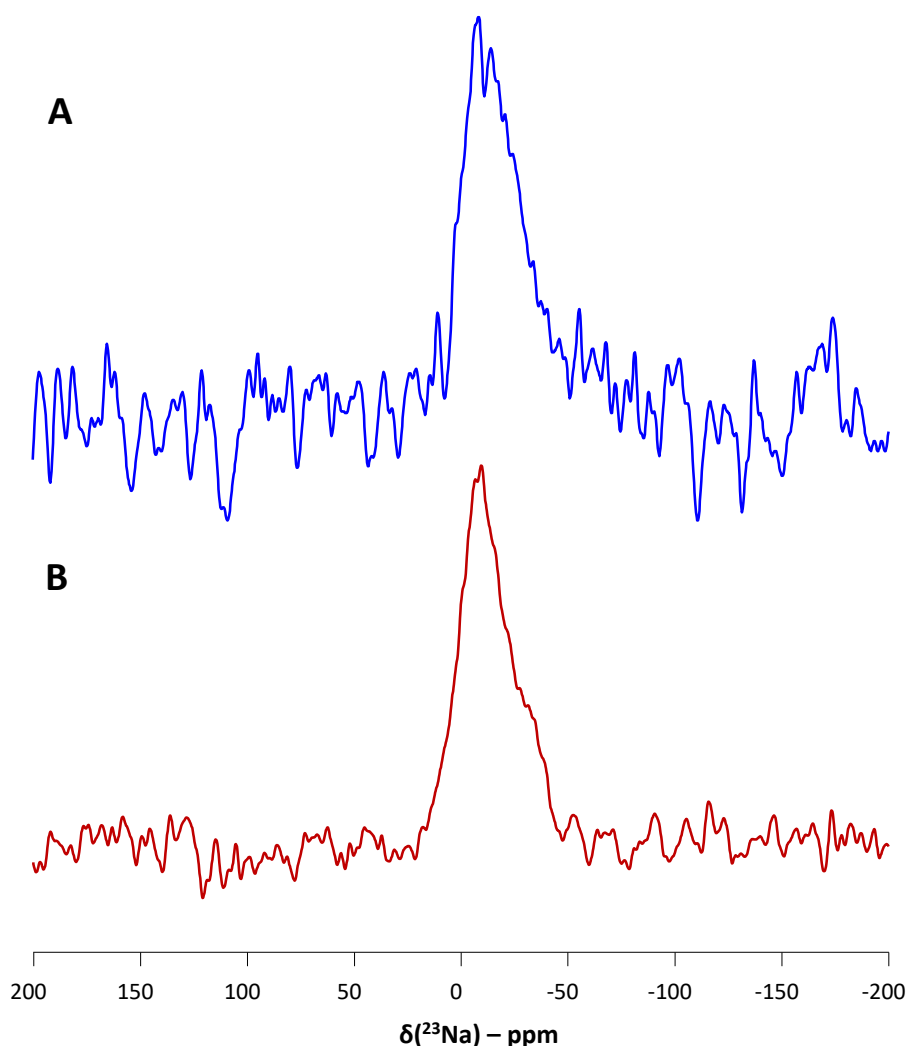


Figure 28 : Spectres en acquisition directe ^{23}Na de CAP-1 en conditions (A) humides dans de l'éthanol pur et (B) sèches. $B_0 = 300$ MHz.

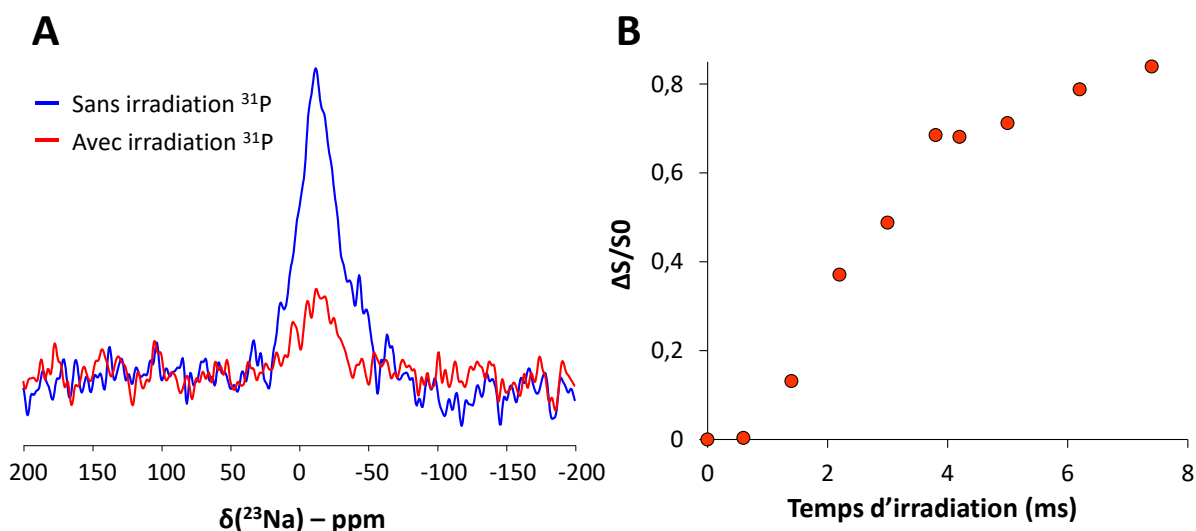


Figure 29 : (A) Comparaison des spectres ^{23}Na REDOR obtenu sans (bleu) et après 4,2 ms d'irradiation ^{31}P (rouge) pour CAP-1. (B) Profil de déphasage en fonction du temps d'irradiation. $B_0 = 300$ MHz.

La phase transitoire CAP-2 a fait l'objet d'une analyse similaire en conditions sèches. La présence de sodium a été confirmée par RMN ^{23}Na à l'état solide (Figure 30A). Le déplacement chimique du large massif obtenu est à -8 ppm et sa largeur a été estimée à environ 28 ppm à mi-hauteur ce qui semble être similaire à CAP-1. Dans l'objectif de vérifier la proximité spatiale de ces ions Na^+ avec les groupements phosphates, nous avons réalisé une expérience bidimensionnelle ^{23}Na — ^{31}P par CP-D-HMQC avec recouplage ^{23}Na . Ce type d'expérience est similaire à une expérience de type TEDOR⁴³ ou double-CP⁴⁴ mais est plus adaptée à l'étude de noyaux quadripolaires⁴⁵ tel que, ici, ^{23}Na . Tout comme une expérience Hetcor ou REDOR, l'objectif est de recoupler l'interaction dipolaire hétéronucléaire, ici ^{23}Na — ^{31}P , ce qui le cas échéant démontre une proximité spatiale entre les espèces de ces 2 noyaux. Le spectre 2D correspondant est présenté en Figure 30B et démontre ainsi la proximité spatiale entre les ions Na^+ et CAP-2. Encore une fois, ces résultats ne permettent pas de trancher l'origine des ions Na^+ dans la structure.

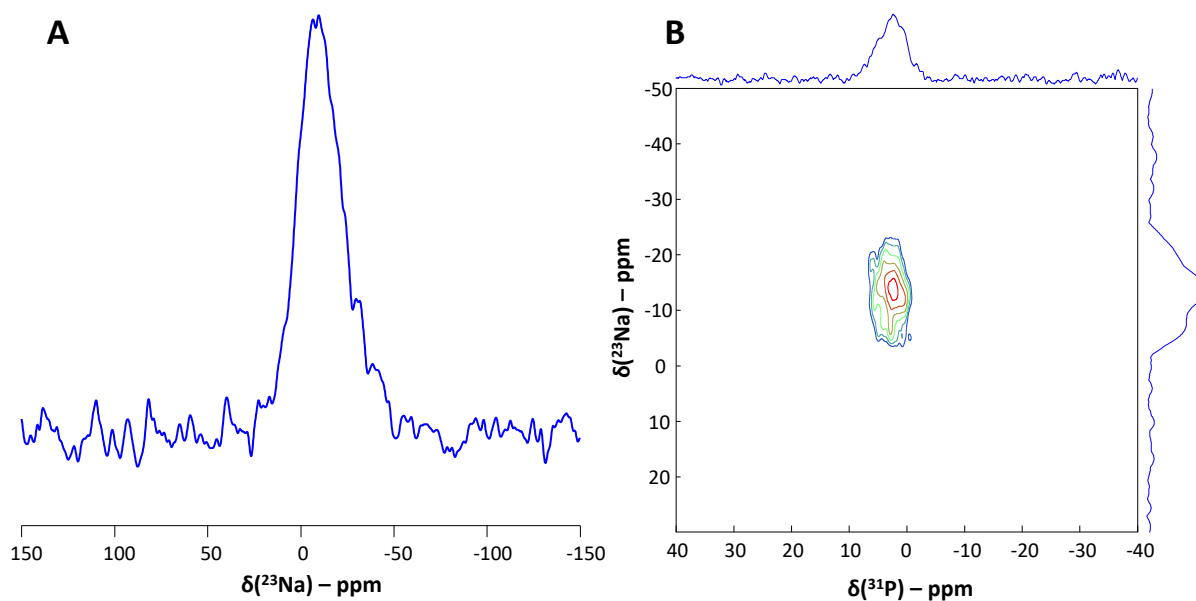


Figure 30 : (A) Spectre ^{23}Na de CAP-2 en acquisition directe. (B) Spectre 2D ^{23}Na — ^{31}P CP-DHMQC de CAP-2 avec excitation par polarisation croisée ^1H — ^{31}P . Temps de recouplage = 800 μs . Temps de contact = 1 ms.

Enfin, la phase finale d'HAP a subi une analyse similaire après lyophilisation. L'acquisition directe ^{23}Na démontre une nouvelle fois la présence d'ions Na^+ dans la structure (Figure 31A). Le spectre obtenu est centré à -11 ppm et présente une largeur à mi-hauteur de 21 ppm. Il se trouve donc être similaire aux signatures spectrales ^{23}Na de CAP-1 et de CAP-2, bien que légèrement moins large. Cette différence de largeur traduit un environnement légèrement plus ordonné autour des ions Na^+ ce qui est certainement dû à la cristallinité d'HAP.

De plus, nous avons effectué une expérience 2D ^1H — ^{23}Na (Figure 31B) mettant en évidence les proximités spatiales des ions Na^+ avec ses environnements protonés voisins. Dans cette expérience, nous remarquons plusieurs corrélations des ions Na^+ avec un signal à 0 ppm dans la dimension ^1H caractéristique d'un environnement apatitique, ainsi qu'avec un large signal de 4 à 17 ppm dont le déplacement chimique rappelle l'environnement hydraté et contenant des ions HPO_4^{2-} dans la couche amorphe de surface de l'apatite. Cette expérience met une nouvelle fois en lumière la question du rôle des ions Na^+ dans la structure. En particulier, la corrélation avec les OH^- apatitiques démontre que les ions Na^+ ne restent pas en surface et pénètrent bien au cœur cristallin du matériau. En effet, ces derniers ont déjà été observés capables de se substituer aux ions Ca^{2+} dans des environnements apatitiques^{41,46}. Néanmoins, les ions Na^+ présents dans un environnement désordonné pourraient aussi se situer dans la couche de surface amorphe, suggérant que ces derniers pourraient à la fois substituer des ions Ca^{2+} ou être présents en tant que contre-ions.

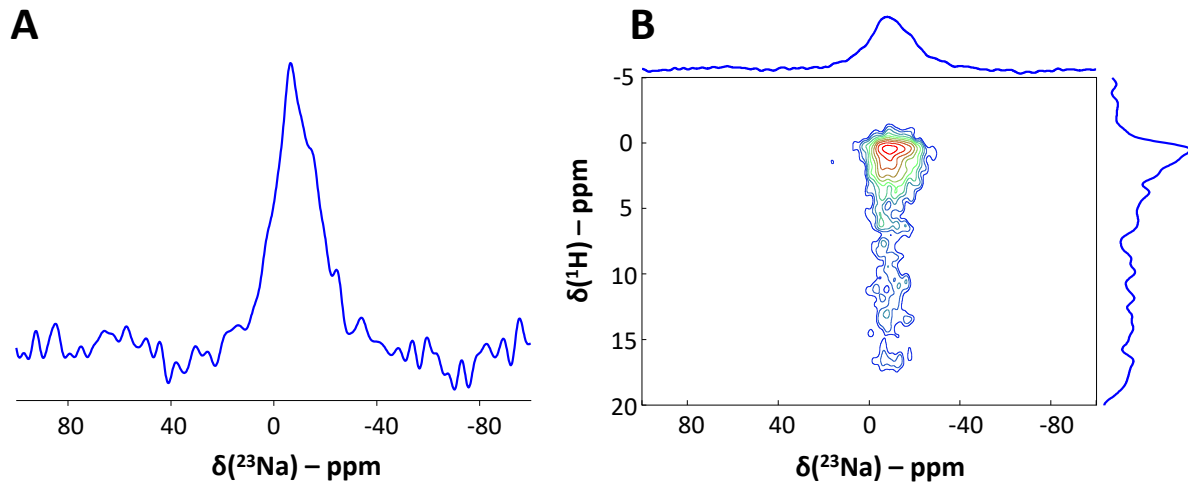


Figure 31 : (A) Spectre ^{23}Na en acquisition directe et (B) spectre 2D ^1H — ^{23}Na Hetcor d’HAP en conditions sèches. Temps de contact = 500 μs .

Ces arguments sont appuyés par une expérience ^{23}Na — ^{31}P CP-D-HMQC présentée en Figure 32A. En particulier, la comparaison du signal ^{31}P issu de l’expérience ^{23}Na — ^{31}P CP-D-HMQC avec les contributions du cœur cristallin et de la surface amorphe extraits d’une expérience Hetcor ^1H — ^{31}P est présentée Figure 32B. En particulier, la largeur à mi-hauteur du signal d’intérêt se trouve être entre plus large que le signal apatitique d’une hydroxyapatite biomimétique, mais moins large que le signal ^{31}P correspondant à la couche de surface amorphe de cette dernière. Nous en déduisons que l’environnement phosphaté proche des Na^+ est à proximité de tous les ions Ca^{2+} présents dans l’hydroxyapatite biomimétique.

Dans cette partie, nous avons pu démontrer la présence d’ions Na^+ dans toutes les espèces solides impliquées dans la formation d’hydroxyapatite en conditions de précipitation proches des conditions physiologiques. A ce jour, nous ne pouvons pas détailler le rôle de ces ions, qu’ils soient présents en tant que contre-ions ou substituant des ions Ca^{2+} . Des expériences d’analyse élémentaire de type ICP-OES pourraient permettre d’obtenir ce niveau de détail. La présence d’ions Na^+ dans les espèces de prénucléation n’a à ce jour pas pu être prouvée. Des études en ^{23}Na — ^{31}P MAS-DNP sur solutions vitrifiées, et plus particulièrement des expériences de recouplage dipolaire ^{23}Na — ^{31}P telles que le REDOR, le double CP ou le D-HMQC permettraient néanmoins d’apporter des réponses.

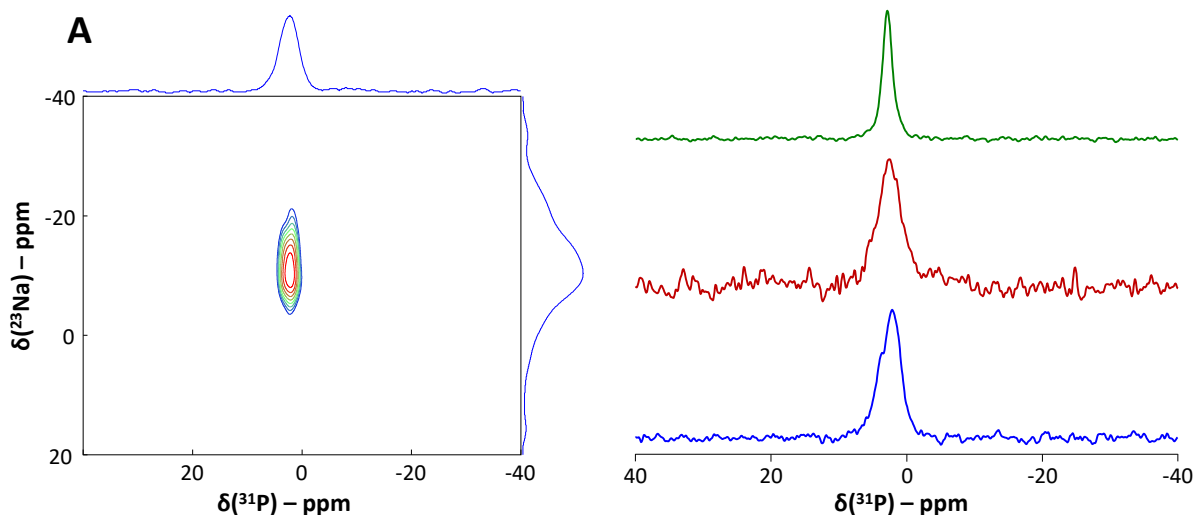


Figure 32 : (A) Spectre 2D ^{23}Na — ^{31}P CP-D-HMQC d’HAP en conditions sèches. (B) de bas en haut, tranche ^{31}P extraite du spectre 2D ^{23}Na — ^{31}P CP-D-HMQC à $\delta(^{23}\text{Na}) = -11$ ppm, tranches ^{31}P extraites du spectre 2D ^1H — ^{31}P Hetcor à $\delta(^1\text{H}) = 5$ ppm et $\delta(^1\text{H}) = 1$ ppm, ces 2 dernières correspondant aux contributions amorphe de surface (rouge, milieu) et cristalline (vert, haut) d’HAP. Temps de recouplage = 800 μs . Temps de contact = 1 ms.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé les espèces transitoires solides intervenant dans le mécanisme non-classique de la nucléation de l’hydroxyapatite en conditions de concentrations et de pH proches des systèmes biologiques.

Nos résultats suggèrent que l’association de 2 espèces de prénucléation conduit à la nucléation de clusters de postnucléation de composition moyenne $[\text{Ca}_4\text{X}_4(\text{HPO}_4)_6]^{4-} \cdot n\text{H}_2\text{O}$, où X est un cation monovalent et $5 \leq n \leq 5,5$. Ces clusters solides différencieraient ainsi de la structure des clusters de Posner $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ initialement proposé comme particule élémentaire de l’ACP. Ces clusters s’agrègeraient en sphères de plus de 100 nm de diamètre. Les agrégats sphériques évolueraient vers des agrégats de plaquettes CAP-2. Nos analyses suggèrent que cette dernière a une composition moyenne variant selon la quantité de calcium dans la structure suivant la formule chimique variable $[\text{Ca}_{6+n}(\text{HPO}_4)_4(\text{PO}_4)_2]^{-2+2n}$ (où $0 \leq n \leq 2$). Dans le cas où $n = 2$, la structure obtenue serait chargée négativement et pourrait être contrebalancée par l’intégrations d’ions hydroxyles OH^- dans la structure de manière à obtenir $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_2(\text{HPO}_4)_4(\text{OH})_2$. C’est notamment leur détection, bien que discutable, qui nous amène à décrire CAP-2 comme étant une phase précurseur à l’hydroxyapatite déficiente en ions calcium.

La phase CAP-2 se transforme ensuite en plaquettes d’hydroxyapatite biomimétique. En particulier, cette dernière contient une couche de surface amorphe hydratée et riche en ions HPO_4^{2-} dont nous apportons des informations structurales en conditions hydratées. En effet, nous avons identifié une phase dont les déplacements chimiques ne semblent correspondre avec aucune phase de phosphate de calcium connue. Par ailleurs, nos expériences par RMN ^{23}Na prouvent la présence d’ions Na^+ qui pourraient jouer un double rôle de contre-ions et de substituant au calcium. Si le premier

rôle permettrait de confirmer les structures proposées chargées négativement dans ce chapitre, la présence de sodium dans les phases précédant la formation d'hydroxyapatite pourrait renseigner sur l'origine des substitutions cationiques observées *in vivo*.

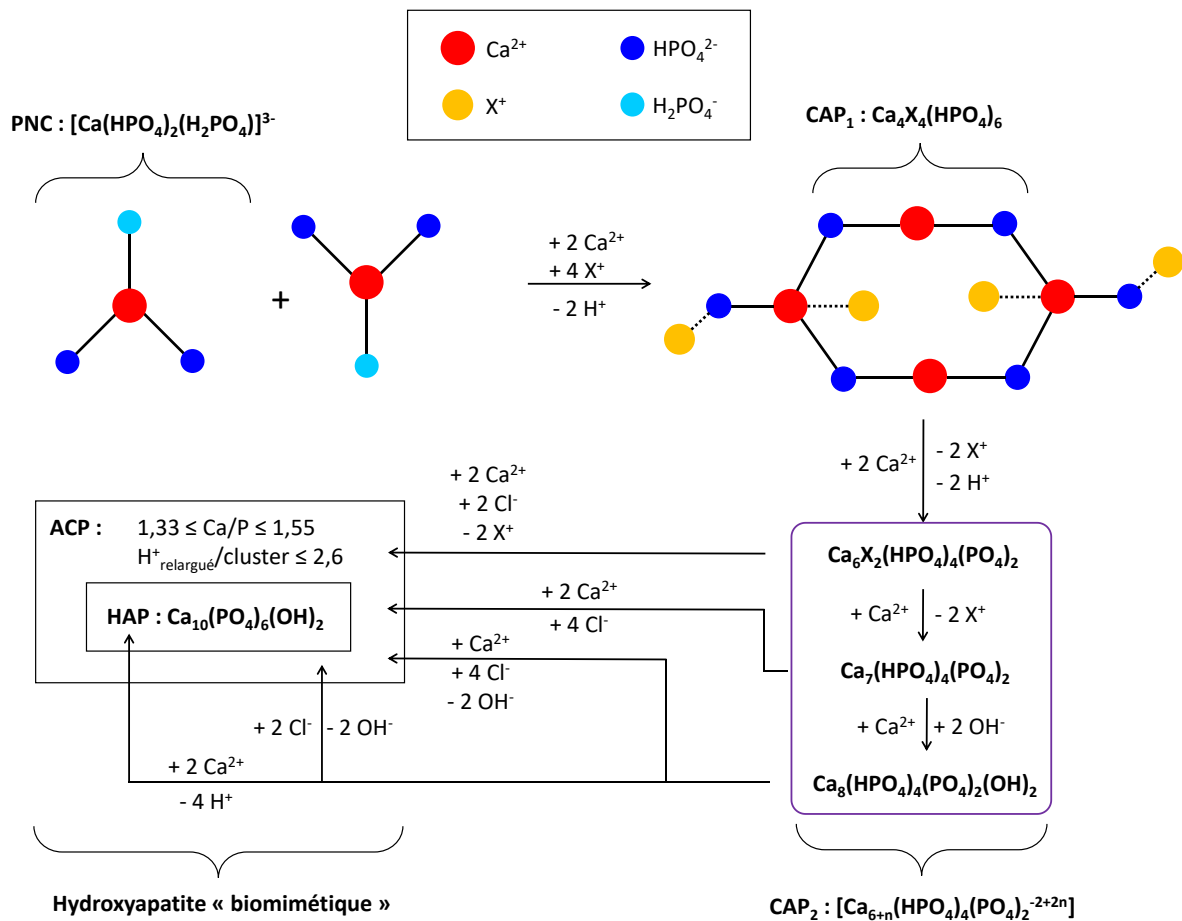


Figure 33 : Proposition de mécanisme de l'évolution des espèces de prénucléation jusqu'à l'hydroxyapatite biomimétique.

L'ensemble des structures déterminées dans ce chapitre nous ont permis de proposer un mécanisme dont le cheminement est proposé en Figure 33. En particulier, les étapes de prénucléation et de nucléation rejoignent les conclusions tirées par Habraken *et al.*¹⁵, à la différence que les clusters solides de prénucléation se forment par l'association de 2 clusters de prénucléation. Les analyses des rapports Ca/P et $\text{H}^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$ en fonction du temps semblent ensuite infirmer la théorie de l'OCP déficient en ions Ca^{2+} concernant la phase transitoire et la présence d'OCP. Par ailleurs, nous apportons des détails structuraux à propos de la surface amorphe recouvrant les particules d'HAP biomimétiques. Nous tenons à ajouter ici que seules les étapes de prénucléation et de nucléation sont bien comprises. La suite des événements concernant CAP-2 et sa transformation en HAP biomimétique est encore floue. Les mécanismes proposés en Figure 33 à ces étapes ne représentent ainsi que des propositions, bien qu'en accord avec les analyses des rapports Ca/P et $\text{H}^+_{\text{relargué}}/\text{cluster}$. L'utilisation de la RMN ^{35}Cl ou ^{37}Cl permettrait éventuellement de détecter la présence d'ions Cl^- et de confirmer, ou infirmer, certaines de ces propositions. Des expériences de diffraction des rayons X en conditions hydratées combinées à des mesures de type EXAFS permettraient peut-être d'en apprendre plus quant à la phase de CAP-2 et de la phase précédant la formation de la couche amorphe.

Références bibliographiques

- (1) Glimcher, M.; Krane, S. *The Organization and Structure of Bone, and the Mechanism of Calcification*; New York: Academic Press Inc., 1968.
- (2) Robinson, R. A.; Watson, M. L. Collagen-Crystal Relationships in Bone as Seen in the Electron Microscope. *Anat. Rec.* **1952**, *114* (3), 383–409. <https://doi.org/10.1002/ar.1091140302>.
- (3) Posner, A. S.; Betts, F. Synthetic Amorphous Calcium Phosphate and Its Relation to Bone Mineral Structure. *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8* (8), 273–281. <https://doi.org/10.1021/ar50092a003>.
- (4) Nelson, D. G.; Featherstone, J. D.; Duncan, J. F.; Cutress, T. W. Paracrystalline Disorder of Biological and Synthetic Carbonate-Substituted Apatites. *J. Dent. Res.* **1982**, *61* (11), 1274–1281. <https://doi.org/10.1177/00220345820610111301>.
- (5) Ramírez-Rodríguez, G. B.; Delgado-López, J. M.; Gómez-Morales, J. Evolution of Calcium Phosphate Precipitation in Hanging Drop Vapor Diffusion by in Situ Raman Microspectroscopy. *CrystEngComm* **2013**, *15* (12), 2206–2212. <https://doi.org/10.1039/C2CE26556G>.
- (6) Robin, M.; Euw, S. V.; Renaudin, G.; Gomes, S.; Krafft, J.-M.; Nassif, N.; Azaïs, T.; Costentin, G. Insights into OCP Identification and Quantification in the Context of Apatite Biomineralization. *CrystEngComm* **2020**, *22* (16), 2728–2742. <https://doi.org/10.1039/C9CE01972C>.
- (7) Termine, J. D.; Posner, A. S. Calcium Phosphate Formation in Vitro: I. Factors Affecting Initial Phase Separation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *140* (2), 307–317. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90071-8).
- (8) Termine, J. D.; Peckauskas, R. A.; Posner, A. S. Calcium Phosphate Formation in Vitro: II. Effects of Environment on Amorphous-Crystalline Transformation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *140* (2), 318–325. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90072-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90072-X).
- (9) Christoffersen, J.; Christoffersen, M. R.; Kibalczyk, W.; Andersen, F. A. A Contribution to the Understanding of the Formation of Calcium Phosphates. *J. Cryst. Growth* **1989**, *94* (3), 767–777. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(89\)90102-4](https://doi.org/10.1016/0022-0248(89)90102-4).
- (10) Eanes, E. D.; Termine, J. D.; Nylen, M. U. An Electron Microscopic Study of the Formation of Amorphous Calcium Phosphate and Its Transformation to Crystalline Apatite. *Calcif. Tissue Res.* **1973**, *12* (1), 143–158. <https://doi.org/10.1007/BF02013730>.
- (11) Walton, A. G.; Bodin, W. J.; Furedi, H.; Schwartz, A. Nucleation of Calcium Phosphate from Solution. *Can. J. Chem.* **1967**, *45* (22), 2695–2701. <https://doi.org/10.1139/v67-439>.
- (12) Montes-Hernandez, G.; Renard, F. Nucleation of Brushite and Hydroxyapatite from Amorphous Calcium Phosphate Phases Revealed by Dynamic In Situ Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124* (28), 15302–15311. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c04028>.
- (13) Dey, A.; Bomans, P. H. H.; Müller, F. A.; Will, J.; Frederik, P. M.; With, G. de; Sommerdijk, N. A. J. M. The Role of Prenucleation Clusters in Surface-Induced Calcium Phosphate Crystallization. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (12), 1010–1014. <https://doi.org/10.1038/nmat2900>.
- (14) Du, L.-W.; Bian, S.; Gou, B.-D.; Jiang, Y.; Huang, J.; Gao, Y.-X.; Zhao, Y.-D.; Wen, W.; Zhang, T.-L.; Wang, K. Structure of Clusters and Formation of Amorphous Calcium Phosphate and Hydroxyapatite: From the Perspective of Coordination Chemistry. *Cryst. Growth Des.* **2013**, *13* (7), 3103–3109. <https://doi.org/10.1021/cg400498j>.
- (15) Habraken, W. J. E. M.; Tao, J.; Brylka, L. J.; Friedrich, H.; Bertinetti, L.; Schenk, A. S.; Verch, A.; Dmitrovic, V.; Bomans, P. H. H.; Frederik, P. M.; Laven, J.; Schoot, P. van der; Aichmayer, B.; With, G. de; DeYoreo, J. J.; Sommerdijk, N. A. J. M. Ion-Association Complexes Unite Classical

- and Non-Classical Theories for the Biomimetic Nucleation of Calcium Phosphate. *Nat. Commun.* **2013**, *4* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms2490>.
- (16) Lin, T.-J.; Chiu, C.-C. Structures and Infrared Spectra of Calcium Phosphate Clusters by Ab Initio Methods with Implicit Solvation Models. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* **2017**, *20* (1), 345–356. <https://doi.org/10.1039/c7cp05975b>.
- (17) Garcia, N. A.; Malini, R. I.; Freeman, C. L.; Demichelis, R.; Raiteri, P.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Harding, J. H.; Gale, J. D. Simulation of Calcium Phosphate Prenucleation Clusters in Aqueous Solution: Association beyond Ion Pairing. *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19* (11), 6422–6430. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00889>.
- (18) Mancardi, G.; Tamargo, C. E. H.; Tommaso, D. D.; Leeuw, N. H. de. Detection of Posner's Clusters during Calcium Phosphate Nucleation: A Molecular Dynamics Study. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (35), 7274–7284. <https://doi.org/10.1039/C7TB01199G>.
- (19) Dorozhkin, S. V. Amorphous Calcium (Ortho)Phosphates. *Acta Biomater.* **2010**, *6* (12), 4457–4475. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.06.031>.
- (20) Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Glimcher, M. J. Bone Mineral: Update on Chemical Composition and Structure. *Osteoporos. Int.* **2009**, *20* (6), 1013–1021. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-0860-y>.
- (21) Von Euw, S.; Ajili, W.; Chan-Chang, T.-H.-C.; Delices, A.; Laurent, G.; Babonneau, F.; Nassif, N.; Azaïs, T. Amorphous Surface Layer versus Transient Amorphous Precursor Phase in Bone – A Case Study Investigated by Solid-State NMR Spectroscopy. *Acta Biomater.* **2017**, *59*, 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.040>.
- (22) Kolodziejcki, W.; Klinowski, J. Kinetics of Cross-Polarization in Solid-State NMR: A Guide for Chemists. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (3), 613–628. <https://doi.org/10.1021/cr000060n>.
- (23) Harris, K. D. M.; Hughes, C. E.; Williams, P. A. In Situ Solid-State NMR Studies of Crystallization Processes. In *Advances in Organic Crystal Chemistry: Comprehensive Reviews 2015*; Tamura, R., Miyata, M., Eds.; Springer Japan: Tokyo, 2015; pp 31–53. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55555-1_3.
- (24) van Rossum, B.-J.; Förster, H.; de Groot, H. J. M. High-Field and High-Speed CP-MAS ¹³C NMR Heteronuclear Dipolar-Correlation Spectroscopy of Solids with Frequency-Switched Lee-Goldburg Homonuclear Decoupling. *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 516–519. <https://doi.org/10.1006/jmre.1996.1089>.
- (25) Eichert, D.; Sfihi, H.; Combes, C.; Rey, C. Specific Characteristics of Wet Nanocrystalline Apatites. Consequences on Biomaterials and Bone Tissue. *Key Eng. Mater.* **2004**, *254–256*, 927–930. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.254-256.927>.
- (26) Solovyov, L. A. Diffraction Analysis of Mesostructured Mesoporous Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (9), 3708–3720. <https://doi.org/10.1039/C2CS35248F>.
- (27) Hohwy, M.; Rienstra, C. M.; Jaroniec, C. P.; Griffin, R. G. Fivefold Symmetric Homonuclear Dipolar Recoupling in Rotating Solids: Application to Double Quantum Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110* (16), 7983–7992. <https://doi.org/10.1063/1.478702>.
- (28) Santos, R. A.; Wind, R. A.; Bronnimann, C. E. 1H CRAMPS and 1H-31P HetCor Experiments on Bone, Bone Mineral, and Model Calcium Phosphate Phases. *J. Magn. Reson. B* **1994**, *105* (2), 183–187. <https://doi.org/10.1006/jmrb.1994.1120>.
- (29) Mehring, M. *High Resolution NMR Spectroscopy in Solids*; Springer: Berlin, Heidelberg, 1976. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-96332-2>.

- (30) Kentgens, A. P. M.; Verhagen, R. Advantages of Double Frequency Sweeps in Static, MAS and MQMAS NMR of Spin $I=3/2$ Nuclei. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *300* (3), 435–443. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(98\)01402-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)01402-X).
- (31) Wong, A.; Laurencin, D.; Wu, G.; Dupree, R.; Smith, M. E. An Ab Initio Quantum Chemical Investigation of ^{43}Ca NMR Interaction Parameters for the Ca^{2+} Sites in Organic Complexes and in Metalloproteins. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (40), 9807–9813. <https://doi.org/10.1021/jp801015y>.
- (32) Kojima, Y.; Sakama, K.; Toyama, T.; Yasue, T.; Arai, Y. Dehydration of Water Molecule in Amorphous Calcium Phosphate. *Phosphorus Res. Bull.* **1994**, *4*, 47–52. https://doi.org/10.3363/prb1992.4.0_47.
- (33) Tõnsuaadu, K.; Gross, K. A.; Plūduma, L.; Veiderma, M. A Review on the Thermal Stability of Calcium Apatites. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2012**, *110* (2), 647–659. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1877-y>.
- (34) Cho, G.; Wu, Y.; Ackerman, J. L. Detection of Hydroxyl Ions in Bone Mineral by Solid-State NMR Spectroscopy. *Science* **2003**, *300* (5622), 1123–1127. <https://doi.org/10.1126/science.1078470>.
- (35) Roveri, N.; Palazzo, B.; Iafisco, M. The Role of Biomimetism in Developing Nanostructured Inorganic Matrices for Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 861–877. <https://doi.org/10.1517/17425247.5.8.861>.
- (36) Uskoković, V.; Marković, S.; Veselinović, L.; Škapin, S.; Ignjatović, N.; Uskoković, D. P. Insights into the Kinetics of Thermally Induced Crystallization of Amorphous Calcium Phosphate. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (46), 29221–29235. <https://doi.org/10.1039/C8CP06460A>.
- (37) Aue, W. P.; Roufosse, A. H.; Glimcher, M. J.; Griffin, R. G. Solid-State Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Synthetic Solid Phases of Calcium Phosphate: Potential Models of Bone Mineral. *Biochemistry* **1984**, *23* (25), 6110–6114. <https://doi.org/10.1021/bi00320a032>.
- (38) Davies, E.; Duer, M. J.; Ashbrook, S. E.; Griffin, J. M. Applications of NMR Crystallography to Problems in Biomineralization: Refinement of the Crystal Structure and ^{31}P Solid-State NMR Spectral Assignment of Octacalcium Phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (30), 12508–12515. <https://doi.org/10.1021/ja3017544>.
- (39) Vandecandelaere, N.; Rey, C.; Drouet, C. Biomimetic Apatite-Based Biomaterials: On the Critical Impact of Synthesis and Post-Synthesis Parameters. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23* (11), 2593–2606. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4719-y>.
- (40) Gullion, T. Rotational-Echo, Double-Resonance NMR. In *Modern Magnetic Resonance*; Webb, G. A., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2006; pp 713–718. https://doi.org/10.1007/1-4020-3910-7_89.
- (41) Laurencin, D.; Wong, A.; Wojciech, C.; Knowles, J.; Dong, Q.; David, P.; Robert, N.; Gan, Z.; Melinda, D.; Smith, M. E. Probing the Calcium and Sodium Local Environment in Bones and Teeth Using Multinuclear Solid State NMR and X-Ray Absorption Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (5), 1081–1091. <https://doi.org/10.1039/b915708e>.
- (42) Obadia, L.; Deniard, P.; Alonso, B.; Rouillon, T.; Jobic, S.; Guicheux, J.; Julien, M.; Massiot, D.; Bujoli, B.; Bouler, J.-M. Effect of Sodium Doping in β -Tricalcium Phosphate on Its Structure and Properties. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (6), 1425–1433. <https://doi.org/10.1021/cm052135f>.
- (43) Hing, A. W.; Vega, S.; Schaefer, J. Transferred-Echo Double-Resonance NMR. *J. Magn. Reson.* **1969** **1992**, *96* (1), 205–209. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(92\)90305-Q](https://doi.org/10.1016/0022-2364(92)90305-Q).

- (44) Schaefer, J.; McKay, R. A.; Stejskal, E. O. Double-Cross-Polarization NMR of Solids. *J. Magn. Reson.* 1969 **1979**, *34* (2), 443–447. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(79\)90022-2](https://doi.org/10.1016/0022-2364(79)90022-2).
- (45) Venkatesh, A.; Hanrahan, M. P.; Rossini, A. J. Proton Detection of MAS Solid-State NMR Spectra of Half-Integer Quadrupolar Nuclei. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2017**, *84*, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.ssnmr.2017.03.005>.
- (46) Yasar, O. F.; Liao, W.-C.; Mathew, R.; Yu, Y.; Stevansson, B.; Liu, Y.; Shen, Z.; Edén, M. The Carbonate and Sodium Environments in Precipitated and Biomimetic Calcium Hydroxy-Carbonate Apatite Contrasted with Bone Mineral: Structural Insights from Solid-State NMR. *J. Phys. Chem. C* **2021**, *125* (19), 10572–10592. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c11389>.

**Chapitre VII – Etude de l'influence de l'acide
polyaspartique sur la minéralisation d'hydroxyapatite
« biomimétique »**

CHAPITRE VII – ETUDE DE L’INFLUENCE DE L’ACIDE POLYASPARTIQUE SUR LA MINERALISATION D’HYDROXYAPATITE « BIOMIMETIQUE »	305
I. INTRODUCTION	309
II. MATERIELS ET METHODES	311
1) Réaction de minéralisation	311
2) Potentiométrie calcium et pH	313
3) RMN en solution	314
4) Cryo-TEM	314
5) RMN à l’état solide	315
6) MAS-DNP sur solutions vitrifiées	315
III. COMPLEXATION DU CALCIUM	316
1) Potentiométrie calcium	316
2) RMN ⁴³ Ca en solution	317
IV. INFLUENCE SUR LE MECANISME DE PRECIPITATION	319
1) Potentiométrie du calcium	319
2) Observations cryo-TEM	321
V. LES INTERACTIONS AVEC L’ACIDE POLYASPARTIQUES	330
1) La prénucléation	330
2) Les réseaux de nanoparticules	333
3) L’hydroxyapatite biomimétique	346
VI. CONCLUSION	352
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	354

I. Introduction

Ce chapitre s'intéresse à l'influence de l'acide polyaspartique (pAsp) sur la minéralisation de l'hydroxyapatite. En effet, ce polymère chargé négativement est couramment utilisé pour mimer le rôle des protéines non collagéniques acides sur la minéralisation. Ces dernières sont présentes à hauteur de 2—3% dans le tissu osseux¹ et comptent pas moins de 200 protéines différentes dans la matrice extra-cellulaire². Elles peuvent néanmoins être classées en 3 catégories : les protéines GLA, les glycoprotéines et les protéoglycanes³. Ces 3 types de protéines sont capables d'interagir avec les composés de la matrice extracellulaire, les cellules osseuses et les ions en solution et sont donc suspectés d'intervenir à tous les stades de l'ostéogénèse⁴. Cela comprend le contrôle cinétique et spatial de la nucléation, de la croissance et de la morphologie des cristaux, mais aussi la stabilisation de certaines phases minérales. Nous nous intéressons ici plus particulièrement aux SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins), une sous-famille des glycoprotéines qui contiennent une grande quantité de résidus chargés négativement de type aspartate ou glutamate⁵. Cela leur permettrait d'interagir avec les ions calcium⁶ ce qui pourrait augmenter localement la concentration en ion calcium et, ainsi, contrôler la nucléation.

De manière à mieux comprendre le rôle de ce type de protéines, les SIBLINGS ont souvent été remplacés par des polyélectrolytes de synthèse riches en résidus acides, typiquement l'acide polyaspartique (bien que d'autres polymères comme l'acide polyacrylique ou l'acide polyglutamique ont aussi été étudiés^{7,8}). En particulier, le groupe de Laurie Gower a montré que l'action concomitante du pAsp et du collagène permet d'induire la minéralisation d'hydroxyapatite directement dans les fibrilles de collagène (minéralisation intrafibrillaire)^{8,9} et d'obtenir des structures tridimensionnelles proches de l'os, ce qui n'est pas possible uniquement avec du collagène en présence de sels inorganiques (Figure 1A). Pour cela, il a été proposé que le pAsp interagit avec des ions calcium et phosphates pour former un intermédiaire liquide, appelé PILP (polymer-induced liquid-precursor). Le caractère fluide de cette phase faciliterait ainsi son incorporation dans les zones de gap et d'overlap des fibrilles de collagène et pourrait induire la minéralisation intrafibrillaire (Figure 1B)^{10,11}.

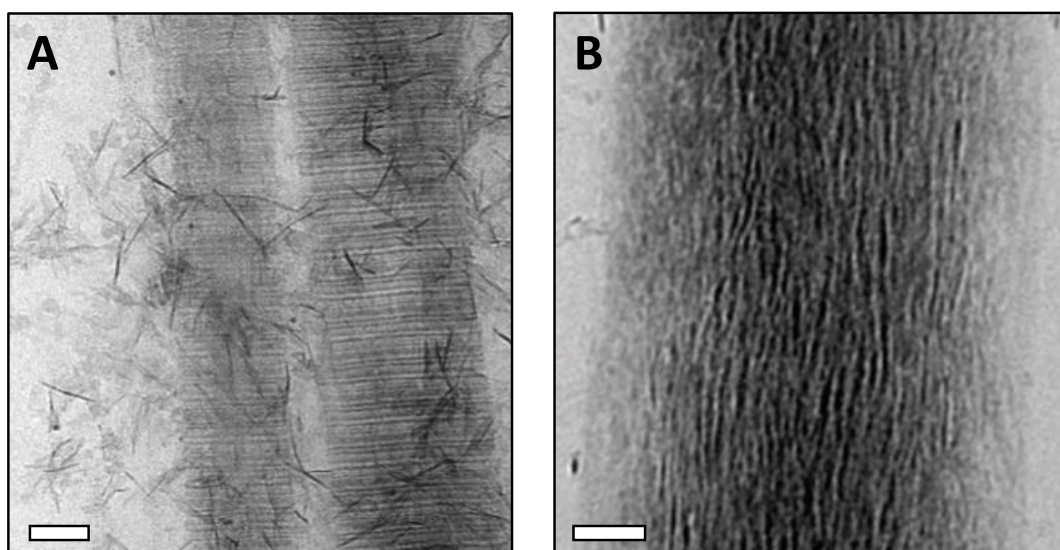


Figure 1 : Observations cryo-TEM de la minéralisation d'hydroxyapatite en présence de collagène (A) sans acide polyaspartique et (B) avec de l'acide polyaspartique. Echelle = 50 nm. Image reproduite d'après Nudelman *et al.*¹¹.

Quelques études décrivent plus en détail son mécanisme d'action sur la précipitation *in vitro* d'hydroxyapatite. En particulier, le pAsp aurait la capacité de stabiliser des phases métastables, tel que le phosphate octocalcique, en s'adsorbant spécifiquement sur certaines surfaces¹². Si dans le cas des carbonates de calcium, la phase PILP est décrite comme des gouttelettes de liquide dense (Figure 2A), les rares observations par cryo-TEM de la phase PILP dans le cas des phosphate de calcium suggèrent qu'elle est constituée de nanoparticules amorphes arrangées en réseau^{11,13-16} (Figure 2B). Ces dernières cristalliseraient puis s'aligneraient de manière orientée sous forme de nano-bâtonnets d'hydroxyapatite^{15,16} (Figure 3). La taille de ces réseaux micrométriques serait inversement proportionnelle à la concentration relative en acide polyaspartique par rapport à la concentration en ions calcium. D'autres études ont montré que la nucléation et la cristallisation sont retardées en présence d'acide polyaspartique avec un effet plus prononcé pour les chaînes les plus longues¹⁷. De même, le nombre de chaînes (c'est-à-dire la concentration) aurait aussi un effet inhibiteur sur les cinétiques de nucléation et de cristallisation¹⁴.

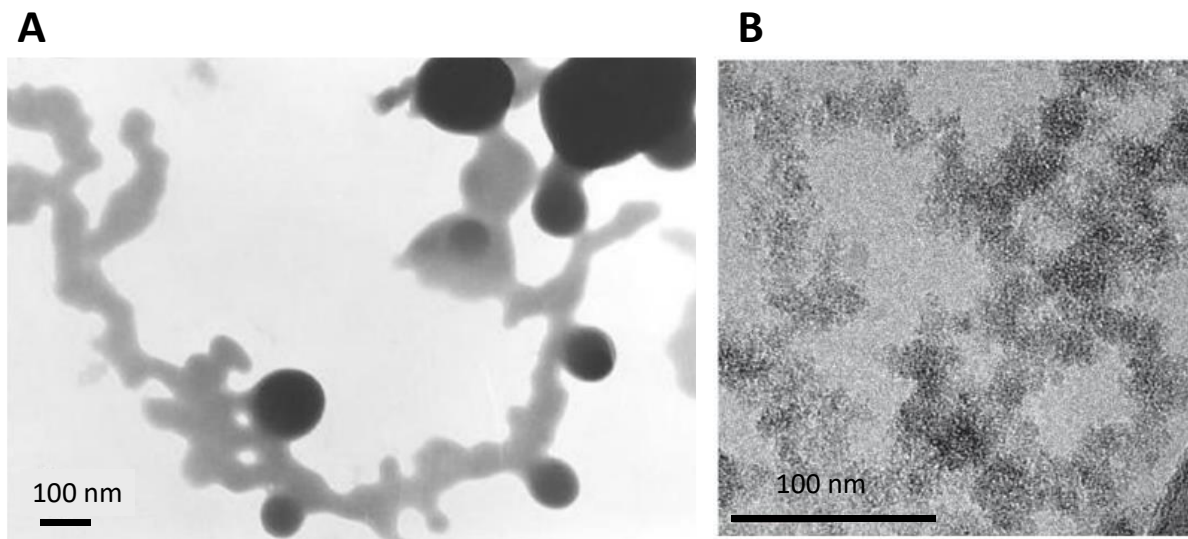


Figure 2 : Observations cryo-TEM des phases PILP observées (A) dans la précipitation de CaCO_3 et (B) d'HAP. Echelle = 100 nm. Images respectivement reproduites d'après Rieger *et al.*¹⁸ et Nudelman *et al.*¹¹.

La minéralisation interfibrillaire d'hydroxyapatite a aussi été étudiée avec l'ostéopontine, une protéine non collagénique faisant partie des SILINGS, faisant elle-aussi intervenir une phase de type PILP^{19,20}. Des travaux combinant expériences de diffusion dynamique de la lumière et simulations par dynamique moléculaire s'intéressant à l'ostéocalcine, la protéine non collagénique la plus abondante de la matrice osseuse faisant partie de la famille des GLA, ont mis en évidence la possible stabilisation de complexes ioniques (espèces de prénucléation) séquestrés par certains résidus de la protéine²¹. Ces exemples montrent bien la pertinence de l'utilisation de l'acide polyaspartique pour mimer les actions des protéines non collagéniques sur la minéralisation de l'hydroxyapatite dans un contexte de biominéralisation. Au-delà de la minéralisation des phosphates de calcium, le phénomène de PILP a aussi été observé en présence d'un polymère chargé pour les carbonates de calcium²²⁻²⁴, de barium et de strontium²⁵, ainsi que dans la formation de cristaux organiques²⁶.

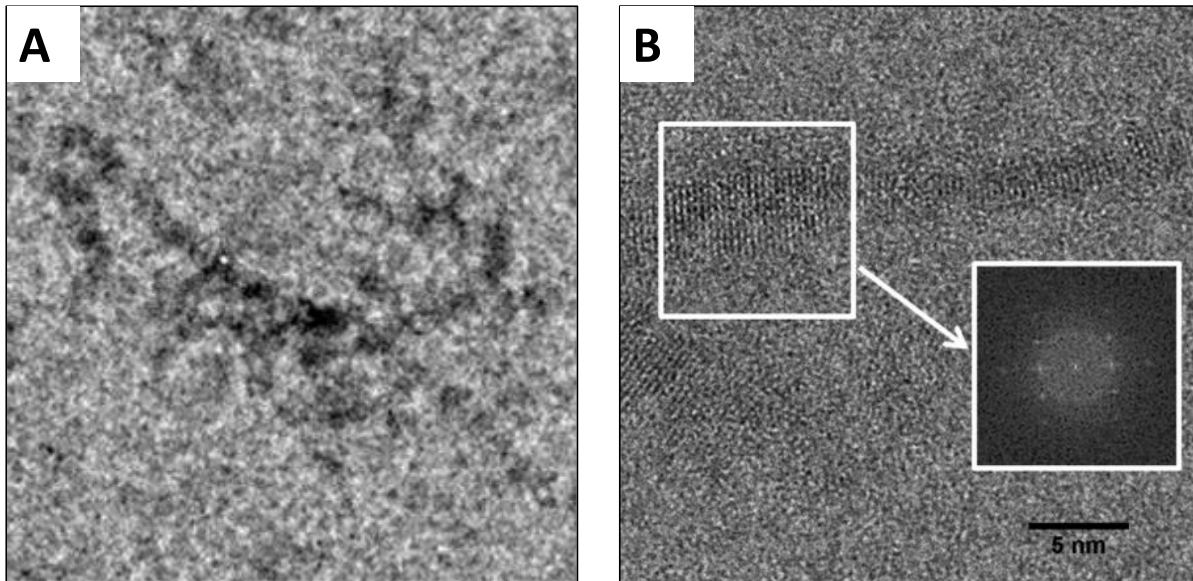


Figure 3 : (A) Cliché cryo-TEM montrant l'alignement des nanoparticules amorphes avant la cristallisation d'HAP (dimension de l'image = 20 nm x 20 nm). (B) Cliché HRTEM d'un nano-bâtonnet d'HAP. Images reproduites d'après Krogstad *et al.*¹⁶.

Ainsi, si les phases de type PILP et la stabilisation de phases amorphes habituellement instables ont pu être observées et exploitées, la structure de ces dernières n'est pas discutée et demeure une inconnue fondamentale dans la compréhension de la formation d'apatite. L'implication du pAsp à tous niveaux de la minéralisation, (prénucléation incluse) sont supposées, mais il y a très peu d'études discutant la nature de ces interactions à l'échelle moléculaire. Ce chapitre s'intéresse aux modes d'interaction de l'acide polyaspartique avec les différentes espèces intermédiaires intervenant dans la formation d'HAP. Pour ce faire, nous nous sommes placés dans des conditions similaires aux conditions de précipitation présentées précédemment. Pour cela, nous avons combiné, une nouvelle fois, la potentiométrie du calcium, la RMN en solution, résolue temporellement ou non, la RMN à l'état solide, la RMN hyperpolarisée sur solutions vitrifiées ainsi que des observations par cryo-TEM.

II. Matériels et méthodes

1) Réaction de minéralisation

Les réactions de minéralisation ont été réalisées en mélangeant de manière isovolumique (i) une solution contenant des ions calcium avec (ii) une solution contenant des ions phosphates avec ou sans acide polyaspartique. L'étude a été réalisée sur deux conditions de précipitation dont les paramètres figurent dans le *Tableau 1*. Elles ont été choisies pour leur temps de précipitation assez rapide (≤ 15 minutes sans pAsp). Ces conditions sont similaires à celles étudiées dans les chapitres précédents, à la différence près que les concentrations initiales en calcium et phosphates sont plus élevées de manière à contrebalancer légèrement l'effet inhibiteur du pAsp.

Condition	[Ca ²⁺] (mM)	[P _i] (mM)	Ca/P	CaxP (mM ²)	pH	[Tris] (mM)	[KCl] (mM)
P26	6,25	4,16	1,50	26	7,4	50	150
P30	6,71	4,47	1,50	30	7,4	50	150

Tableau 1. Paramètres initiaux des conditions de minéralisation utilisées dans ce chapitre.

L'expérience de référence, sans acide polyaspartique a été réalisée sur P26. Pour étudier l'effet inhibiteur de pAsp, différentes concentrations en acide polyaspartique ont été ajoutées dans la condition P26. **Etant donné la dispersion de taille de polymères étudiés, nous avons préféré raisonner en nombres de résidu d'acide aspartique par ion calcium Asp/Ca²⁺.** Le nombre de résidu Asp est aisément calculable comme le rapport d'une masse de poudre de polymère pesée sur la masse d'un monomère qui est une grandeur connue.

De manière à faciliter l'étude par RMN du solide, nous avons synthétisé du pAsp enrichi en ¹³C. Pour cela, nous avons réalisé une polycondensation thermique de l'acide aspartique suivie d'une hydrolyse en milieu basique selon la procédure de Nakato *et al.*²⁷ (Figure 4). Cette polymérisation engendre un intermédiaire de type polysuccinimide qu'il convient ensuite « d'ouvrir » afin d'obtenir l'acide polyaspartique. Brièvement, une masse connue d'acide aspartique était chauffé à 220°C pendant 7h en présence de 10% massique d'H₃PO₄ à but catalytique de manière à obtenir un intermédiaire polysuccinimide. Nous avons ensuite transformé le polysuccinimide en pAsp en dispersant la poudre dans un peu d'eau en présence d'un équivalent de soude NaOH. Après quelques heures d'agitation, la solution a été lyophilisée de manière à obtenir le pAsp sous forme de poudre. La procédure a été réalisée sur de l'acide aspartique non enrichi en ¹³C, puis quatre fois avec les quatre acides aspartiques enrichis en ¹³C à des positions différentes. Enfin, les quatre pAsp enrichis en ¹³C à des positions différentes étaient mélangées physiquement (mélange égal en proportions) préalablement à leur utilisation dans les solutions minéralisantes.

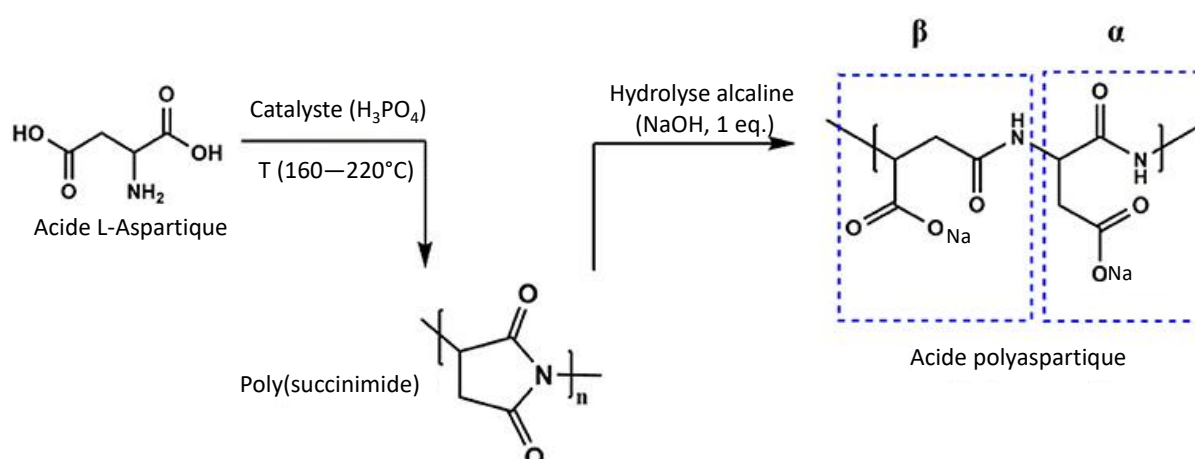


Figure 4 : Synthèse d'acide polyaspartique par polycondensation thermique. Image reproduite d'après Adelnia *et al.*²⁸.

Pour caractériser la distribution en taille des chaînes de pAsp, nous avons réalisé des expériences de chromatographie d'exclusion stérique sur le polysuccinimide, car le pAsp ne se solubilise pas dans les solvants usuels de la chromatographie d'exclusion stérique. Le polysuccinimide obtenu a été rincé plusieurs fois à l'eau et au méthanol avant d'être séché à l'étuve. Ses masses

molaires moyennes en masse M_w et en nombre M_n ont été estimées par chromatographie d'exclusion stérique à 8,5 kDa et à 250 Da, respectivement. Cette différence témoigne d'une grande dispersité (Figure 5A), calculé comme le rapport de ces 2 grandeurs à environ 35. Cette distribution traduit que nous sommes en présence d'un grand nombre de petites chaînes (contenant typiquement 2 à 3 unités de répétition) pour un nombre réduit de grandes chaînes. Cependant, ce sont les chaînes de grande taille qui ont le plus de poids dans l'échantillon. La situation correspondante est schématiquement représentée en Figure 5B.

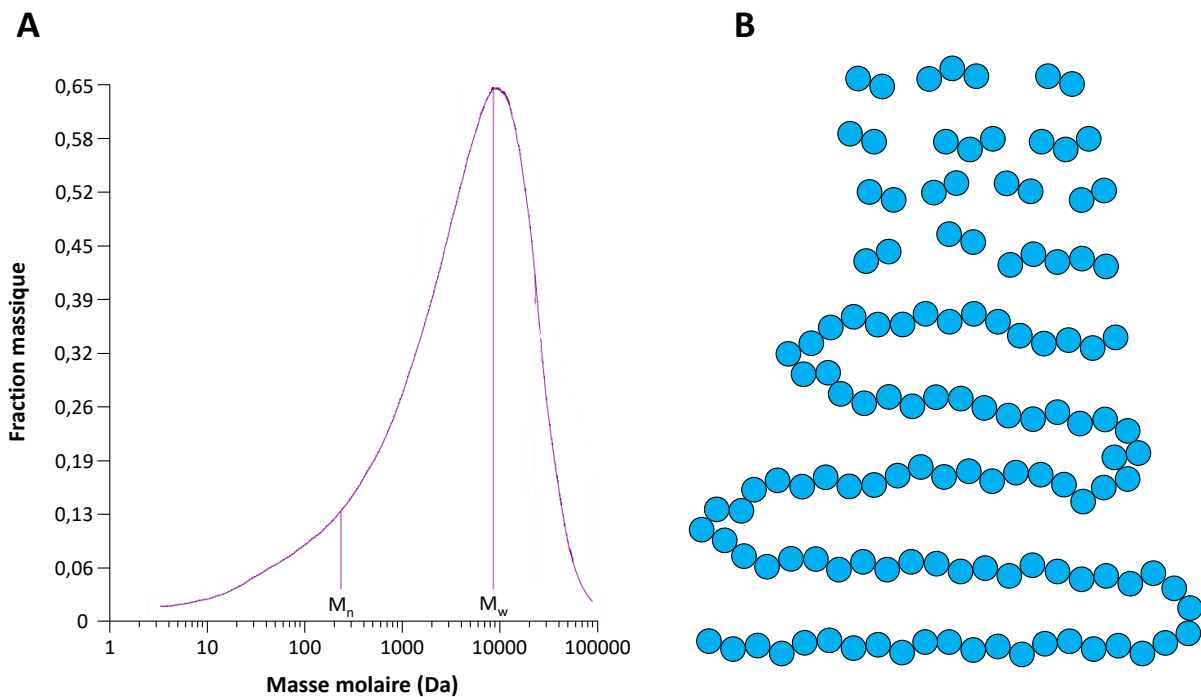


Figure 5 : (A) Distribution en taille de pAsp. (B) Représentation schématique de la distribution de la taille des chaînes de pAsp dans l'échantillon.

La caractérisation des phases solides a été réalisée :

- Soit directement en solution, en conditions humides.
- Soit après centrifugation, trois lavages successifs à l'eau distillée suivis d'une lyophilisation pendant une nuit, en conditions sèches.

2) Potentiométrie calcium et pH

Même procédure qu'au chapitre V.

3) RMN en solution

Toutes les expériences de RMN en solution ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 300 MHz (fréquence de Larmor du proton) avec une sonde BBFO de 5 mm de diamètre.

La complexation entre pAsp et les ions calcium, ainsi que l'évolution de la concentration en ions calcium au cours de la précipitation de P30 ont été étudiés par RMN en solution du noyau ^{43}Ca . Pour cela, les solutions de minéralisation ont été enrichies en ^{43}Ca (58.8%). Les solutions de $^{43}\text{CaCl}_2$ ont été préparées en dissolvant $^{43}\text{CaCO}_3$ dans de l'acide chlorhydrique HCl 1M. Nous avons ensuite laissé reposer les solutions pendant 2 heures de manière à expulser la majorité des ions CO_3^{2-} sous forme de CO_2 gazeux. Nous avons ensuite ajouté de manière contrôlée un tampon, ici Tris, et KCl, de manière à tamponner le pH et fixer la force ionique respectivement. Enfin, de l'eau distillée a été rajoutée et le pH a été fixé à 7,4 avec une électrode pH par ajout de NaOH 1M/0,1M ou HCl 1M/0,1M. Les concentrations finales en calcium, Tris et KCl étaient respectivement la concentration désirée en ions calcium (2 solutions de référence à 10 mM et 6,71 mM), 50 et 150 mM.

Nous avons réalisé des expériences quantitatives *in situ* dans l'objectif de suivre la consommation ionique sur la condition P30. Dans ce cas, nous avons suivi la concentration en calcium par RMN ^{43}Ca en solution (solution enrichie en ^{43}Ca de concentration 6,71 mM), la concentration en phosphates par RMN ^{31}P en solution et la concentration en pAsp par RMN ^1H en solution. La longueur des pulses, la séquence utilisée et la durée entre les pulses pour chaque noyau figurent dans le *Tableau 2*.

Noyau	Durée de l'impulsion t_{90} (μs)	Séquence utilisée	Temps de répétition des impulsions (s)
^1H	10,75	Excitation directe avec présaturation sur le signal du solvant	9
^{31}P	10,8	Excitation directe par impulsion 30°	9
^{43}Ca	18,5	Echo	2

Tableau 2. Paramètres d'acquisition concernant les expériences de RMN ^1H , ^{31}P et ^{43}Ca en solution.

Concernant l'étude de la complexation par RMN en solution du noyau ^{43}Ca , différentes quantités d'acide polyaspartique ont été solubilisées dans la solution de $^{43}\text{CaCl}_2$ (10 mM) de manière à obtenir des concentrations en acide polyaspartique correspondant à 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 6 et 10 Asp/ Ca^{2+} . Les spectres correspondants ont été enregistrés en utilisant la séquence d'écho dont les paramètres figurent dans le *Tableau 2*. Les durées d'acquisition (plusieurs heures à une nuit) variaient en fonction de l'intensité du signal obtenu, dépendant elle-même de la largeur du signal.

4) Cryo-TEM

Même procédure qu'au chapitre V.

5) RMN à l'état solide

Les caractérisations par RMN à l'état solide ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Avance-III 300 MHz. Les rotors ont été insérés dans le spectromètre à l'aide d'une sonde triple résonance de 4 mm et placés à l'angle magique avant d'être mis en rotation à 5 kHz. Les déplacements chimiques ^1H et ^{31}P ont respectivement été fixés à 0 ppm et 2,8 ppm à l'aide d'une hydroxyapatite de synthèse. Le déplacement chimique ^{13}C a été fixé à 43,68 ppm à l'aide d'un échantillon de glycine commercial.

Les échantillons ont premièrement été caractérisés en utilisant les séquences de polarisation croisée et d'excitation directe. L'excitation directe en ^{13}C et ^{31}P a été réalisée en utilisant des impulsions à 90° correspondant à des champs radiofréquence (RF) respectifs de 50 kHz dans les 2 cas. La polarisation croisée a été optimisée en utilisant une rampe 90100.100 et en satisfaisant la condition de Hartmann-Hahn avec un champ RF de 33 kHz sur le ^1H en contact avec des champs RF de 48 kHz sur les voies ^{13}C et ^{31}P . Pour chaque échantillon, le temps de contact (typiquement 1 ms) et la durée entre les pulses (typiquement entre 0,5 et 2s) étaient optimisés de manière à maximiser l'ensemble des signaux. La polarisation croisée et l'excitation directe étaient enregistrées en utilisant un découplage sur la voie ^1H pendant l'acquisition correspondant à un champ RF de 33 kHz. Nous avons aussi réalisé des expériences 2D Hetcor ^1H — ^{13}C et ^1H — ^{31}P en introduisant 160 incréments en t_1 et en utilisant un découplage homonucléaire ^1H de type FSLG²⁹ avec un champ RF de découplage de 100 kHz. Ces expériences seront appelées LGHetcor dans la suite de ce manuscrit. Enfin, les expériences REDOR ont été réalisés avec une excitation par polarisation croisée en utilisant un cyclage de phase de type $\text{xy}8^{30}$. Les impulsions utilisées étaient les mêmes que décrites précédemment, et les impulsions 180° faisaient typiquement 10 μs de long, que l'acquisition se fasse en ^{13}C ou en ^{31}P (c'est-à-dire que l'irradiation REDOR était sur la voie ^{31}P ou ^{13}C , respectivement).

6) MAS-DNP sur solutions vitrifiées

L'interaction des espèces de prénucléation avec le pAsp a été sondée par MAS-DNP sur solution vitrifiée. Pour cela, nous avons utilisé des pAsp enrichis en ^{13}C sur les fonctions carboxylées et avec les conditions de précipitation correspondant à P30 en présence de 0,25 Asp/ Ca^{2+} .

Les caractérisations ont été réalisées sur un spectromètre Bruker opérant à 800 MHz (fréquence de Larmor ^1H) couplé à un gyrotron (527 GHz). Les solutions étaient préparées dans un mélange composé à 20% de glycérol- d_8 , de 30% de D_2O et de 50% de H_2O . Le radical utilisé était TINYPOL à raison de 5 mM. Après quelques minutes de mélange, la solution était transférée dans un rotor en saphir de 3,2 mm de diamètre qui était ensuite introduit dans le spectromètre refroidi à 100K de manière à vitrifier la solution. Le rotor était ensuite mis en rotation à une fréquence de 8 kHz. Les déplacements chimiques ^1H et ^{31}P ont été fixés à 0 et 2,8 ppm avec de l'hydroxyapatite synthétique. Le déplacement chimique ^{13}C a été fixé à 60 ppm en utilisant le signal du glycérol. Les expériences ont toute nécessité une excitation par polarisation croisée avec des champs RF effectifs de 46, 30 et 38 kHz sur les voies ^1H , ^{13}C et ^{31}P . Le découplage proton était fixé à 25 kHz. Les gains en intensité conférés par la DNP ont été calculés comme les rapports des intensités avec et sans micro-ondes et ont été estimés entre 50 et 65 de manière très homogène sur les 3 canaux. Le délai entre les impulsions était optimal à 2s et le temps de contact était optimal à 3 ms pour l'acquisition ^{13}C . L'expérience REDOR a

été réalisée avec une excitation par polarisation croisée sur la voie ^{13}C en utilisant un cyclage de phase de type xy8. Les impulsions à 180° étaient de 17,5 et 11 μs sur les voies ^{13}C et ^{31}P , respectivement.

III. Complexation du calcium

Avant de s'intéresser plus en détail à la précipitation de phosphates de calcium en présence d'acide polyaspartique, il convient d'étudier le comportement de ce polymère en présence d'ions calcium uniquement. Il a été récemment montré que son monomère, l'acide L-aspartique, se complexe avec un ion calcium par résidu ($\text{L-Asp}/\text{Ca}^{2+} = 1$)³¹, rien n'indique que le comportement sera le même en présence du polymère.

1) Potentiométrie calcium

A notre connaissance, la complexation de l'acide polyaspartique par des ions calcium n'a pas été étudiée. La complexation par des polymères peut s'avérer problématique du fait de la polydispersité des chaînes polymériques. Ainsi, nous avons fait le choix, dans la suite de ce chapitre, **de raisonner en termes de résidus d'acide aspartique**. Connaissant la masse molaire d'une unité de répétition, il est relativement aisé de calculer le nombre de résidus acides dans une masse connue d'acide polyaspartique.

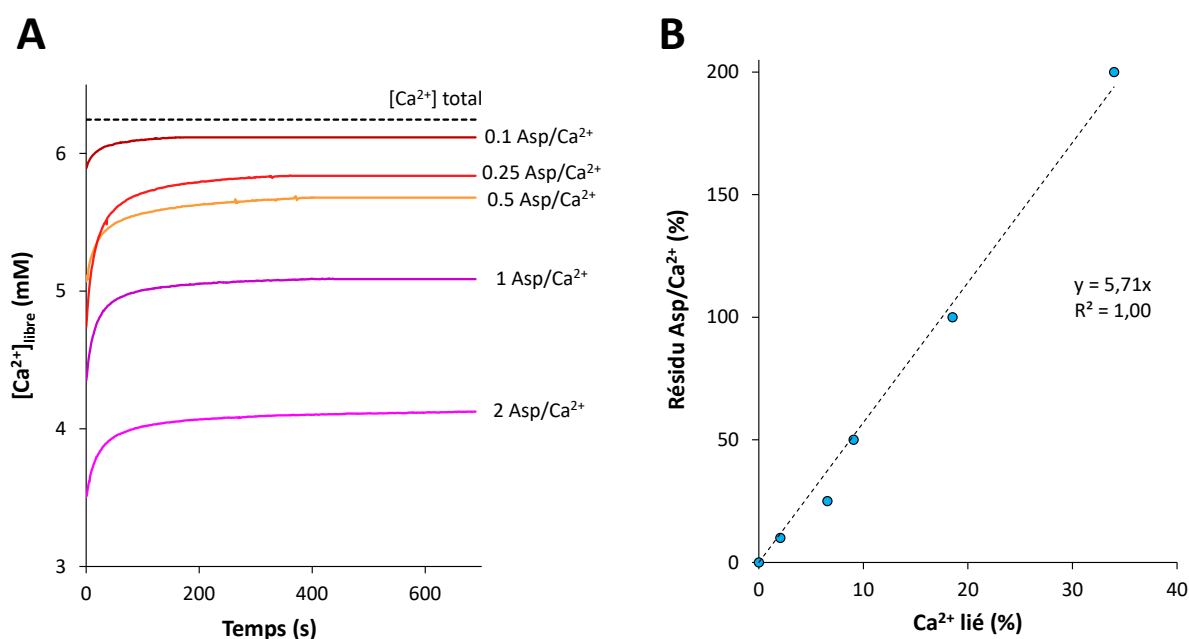


Figure 6 : (A) Mesure de la concentration en Ca^{2+} libre par potentiométrie du calcium dans une solution de CaCl_2 (6,25 mM) en présence de différentes quantités de pAsp ($\text{Asp}/\text{Ca}^{2+} = 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1$ et 2). (B) Détermination du nombre de résidus Asp complexé par ion calcium.

La Figure 6A présente la concentration en Ca^{2+} libre mesurée en fonction du rapport $\text{Asp}/\text{Ca}^{2+}$. Pour rester cohérents avec les prochains paragraphes, les mesures ont été menées dans les mêmes

conditions de pH et de force ioniques et de températures (T_{amb}) que les futures expériences de minéralisation. Plus la solution est concentrée en acide aspartique, *i.e.* plus le nombre de monomère Asp est important, plus la concentration en ions Ca^{2+} libres diminue. Il y a donc une complexation entre Ca^{2+} et l'acide polyaspartique. En reportant le pourcentage de résidu Asp par Ca^{2+} en fonction du Ca^{2+} lié (Figure 6B), on constate une variation linéaire dont la pente correspond au nombre de résidus Asp impliqués dans la complexation d'un ion Ca^{2+} . En moyenne il y a ~6 résidus Asp pour 1 ion Ca^{2+} lié.

2) RMN ^{43}Ca en solution

Des expériences analogues ont été menées par RMN ^{43}Ca en solution. En effet, la RMN en solution est une méthode très efficace pour étudier les phénomènes de complexation, car elle permet parfois d'extraire des paramètres dynamiques³² et d'identifier le site de complexation³³ sur la base du régime d'échange qui peut être rapide ou lent³⁴. Néanmoins, le ^{43}Ca étant un noyau très peu sensible, du fait de sa faible abondance naturelle et rapport gyromagnétique³⁵, les solutions de $CaCl_2$ ont été enrichies isotopiquement en ^{43}Ca .

Comme pour la potentiométrie calcium, une solution de calcium enrichie en ^{43}Ca (10 mM) a été mise en présence de différentes quantités de pAsp. Les spectres obtenus sont présentés en Figure 7A et présentent tous une seule résonance témoignant d'un régime d'échange rapide. Nous observons par ailleurs une augmentation du déplacement chimique $\delta(^{43}Ca)$ de la largeur à mi-hauteur à mesure que la quantité de pAsp augmente qui témoignent d'un changement de l'environnement chimique et de la relaxation que nous attribuons sans doute à une variation de la dynamique. De manière intéressante, la largeur de la résonance (Figure 7B) semble se stabiliser à partir de ~6 résidus Asp/ Ca^{2+} , ce qui est cohérent avec les mesures de potentiométrie du calcium.

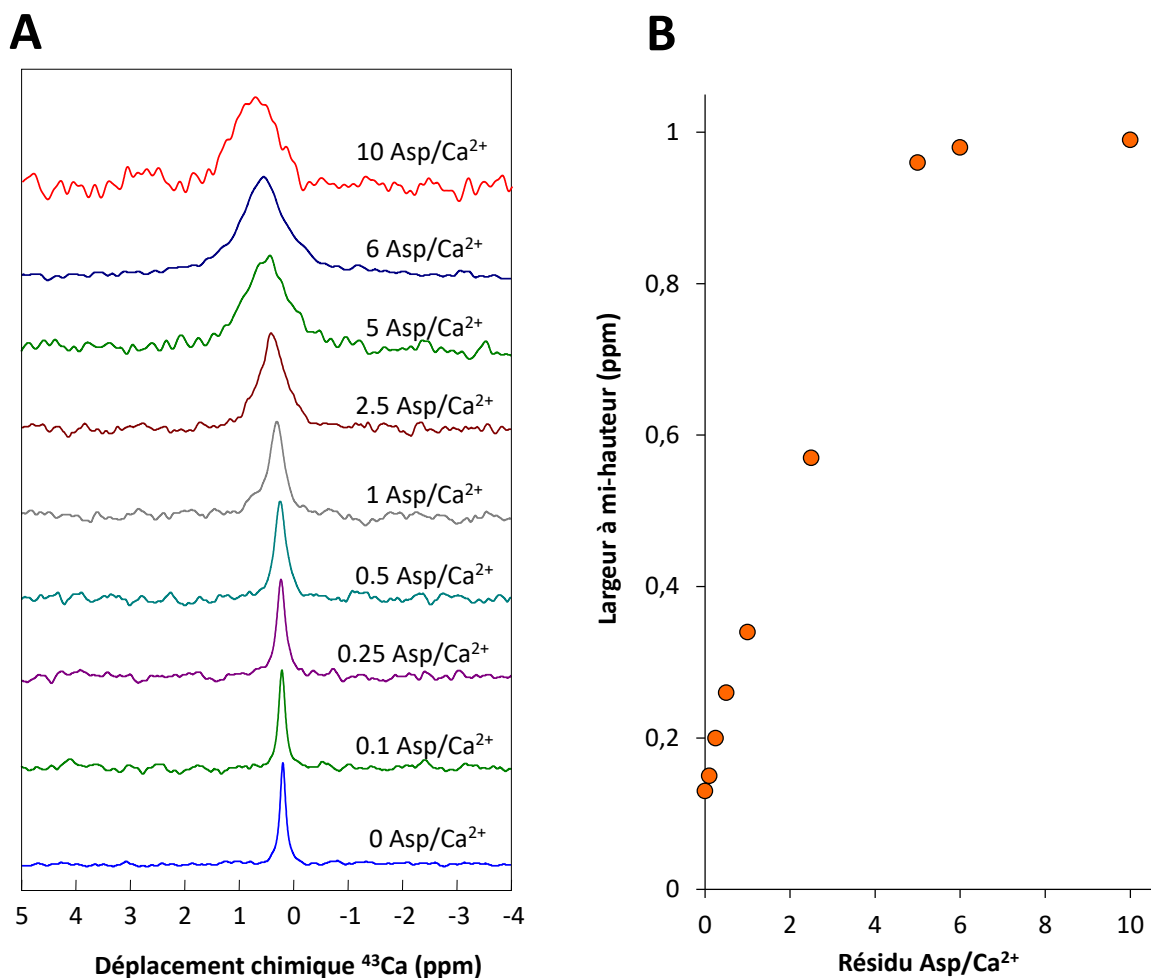


Figure 7 : (A) Spectres ⁴³Ca de solutions de ⁴³CaCl₂ 10 mM en présence de quantités croissantes de pAsp (0,1 , 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 6, 10 Asp/Ca²⁺). (B) Relation entre largeur à mi-hauteur des signaux et nombre de résidu Asp/Ca²⁺.

La largeur d'une résonance en RMN est souvent liée au temps de relaxation transversal effectif T_{2^*} , qui dépend lui-même de la dynamique de l'objet³⁶. Selon Aschauer *et al.*, les liaisons peptidiques de l'acide polyaspartique rendent sa chaîne principale rigide³⁷. Cela pourrait correspondre à notre cas où le T_{2^*} du Ca²⁺ diminue lorsqu'il est complexé. De plus, nos résultats suggèrent qu'en excès de calcium (Asp/Ca<6), l'entièreté des résidus Asp est complexé au moins une fois, ce qui signifie qu'une chaîne polymère peut complexer autant d'ions Ca²⁺ qu'elle n'a d'unités de répétition.

IV. Influence sur le mécanisme de précipitation

Cette partie concerne l'étude de l'influence de la quantité d'acide polyaspartique sur la nucléation et cristallisation de l'HAP à la fois, d'un point de vue cinétique (potentiométrie du calcium) et morphologique (cryo-TEM).

1) Potentiométrie du calcium.

Des mesures de potentiométrie du calcium ont été réalisées pour suivre la concentration en ions Ca^{2+} libres au cours de la précipitation de P26 (*Tableau 1*) sans (Figure 8A) et avec différentes quantités de pAsp (Figure 8B, C, D).

Sans pAsp (Figure 8A), nous retrouvons le même mécanisme en 4 étapes déjà décrit en profondeur dans les chapitres précédents. Brièvement, juste après mélange, nous détectons environ 13% d'ions calcium liés sous formes de PNS. Après 13 minutes, nous observons la formation d'un précipité blanc avec une augmentation soudaine de Ca^{2+} lié jusqu'à 27% correspondant à la nucléation de CAP-1. Après 40 minutes, nous observons une autre augmentation soudaine de Ca^{2+} lié jusqu'à 44% correspondant à la transformation de CAP₁ en CAP₂. Enfin, après quelques minutes, nous observons de nouveau une augmentation de Ca^{2+} jusqu'à environ 60%, plus discrète, que nous attribuons à la cristallisation de CAP₂ en HAP. En présence de 0,025 résidus Asp (Figure 8B), nous observons un mécanisme similaire, bien que la cinétique soit légèrement retardée.

En revanche, on semble observer un mécanisme modifié lorsque l'on utilise 0,05 résidus Asp (Figure 8C), ainsi qu'un effet inhibiteur plus prononcé en termes de cinétique. Cette différence de mécanisme s'observe aussi en présence de 0,1 résidus d'acide aspartique (Figure 8D). Les temps nécessaires à la nucléation et à la cristallisation sont grandement retardés. De plus, nous n'observons que 2 variations notables de la concentration en calcium lié ce qui suggère un mécanisme modifié. Tout d'abord, juste après le mélange, nous détectons environ 20% de calcium lié sous formes d'espèces solubles. Après 1h30 nous notifions que la solution est légèrement trouble ce qui suggère que la nucléation a commencé, sans pour autant observer de variation de concentration en calcium. Cet événement sera décrit par la suite sous l'appellation de « nucléation apparente ». Nous détectons ensuite une légère, mais soudaine augmentation du calcium lié jusqu'à 24% après environ 2h temps de mélange correspondant à la nucléation effective. Après environ 14h, nous remarquons une augmentation importante du calcium lié jusqu'à environ 69%, après quoi nous n'observons plus qu'une augmentation progressive au cours du temps que nous attribuons à la cristallisation d'HAP.

Les temps précédant la nucléation et l'étape finale correspondant à la formation d'hydroxyapatite ont été reportés en fonction du nombre de résidus Asp/ Ca^{2+} en Figure 8E. Cette figure illustre bien l'effet inhibiteur de l'acide polyaspartique sur les différentes étapes intervenant dans la précipitation d'hydroxyapatite. Ces différences pourraient s'expliquer par un changement de mécanisme en présence d'une certaine quantité relative d'acide polyaspartique. Les quantités en calcium liés juste après la nucléation diffèrent selon le nombre d'étapes intervenant dans le mécanisme ce qui peut suggérer une influence de l'acide polyaspartique dès les premières étapes de la nucléation.

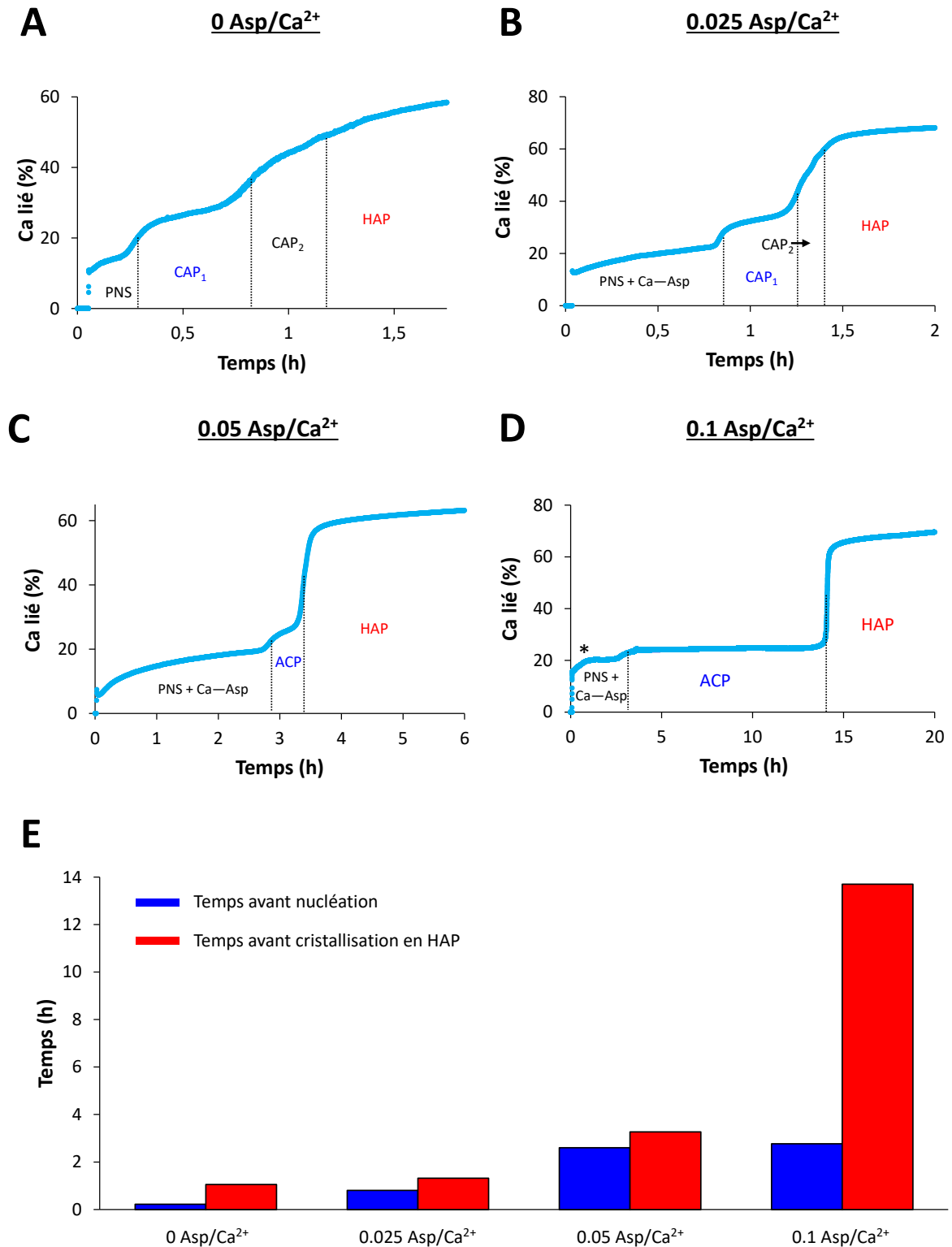


Figure 8 : Détection des ions Ca²⁺ liés par potentiométrie calcium au cours de la précipitation de P26 (A) en l'absence de pAsp, (B) avec 0,025 Asp/Ca²⁺, (C) avec 0,05 Asp/Ca²⁺ et (D) avec 0,1 Asp/Ca²⁺. L'étoile indique une nucléation apparente. (E) Organigramme des temps de nucléation et de cristallisation dans la condition de précipitation P26 en fonction de la concentration en pAsp.

2) Observations cryo-TEM

Par la suite, nous avons réalisé des observations par cryo-TEM dans le but d'observer d'éventuelles différences de morphologies pouvant être liées à ce changement de mécanisme. Les observations en Figure 9 ont été réalisées sur la condition P26 en présence de 0,1 Asp/Ca²⁺. Après 7 min, la solution est encore limpide et nous en sommes encore au stade de la prénucléation. L'observation par cryo-TEM révèle des entités nanométriques peu agrégées (Figure 9A, B). Nous avons déterminé leur taille à environ 2 nm de diamètre (Figure 9C), ce qui est la limite de détection du cryo-TEM au grandissement utilisé. Ces entités ont l'aspect et la taille de clusters de prénucléation, en accord avec les chapitres précédents. Les tailles supérieures sont attribuées à l'agrégation ou à la superposition de PNS sur la grille, bien que ces dernières semblent peu agrégées. Nous expliquons leur faible nombre et un état d'agrégation peu prononcé au temps court du prélèvement, leur plage d'existence allant jusqu'à 2 heures.

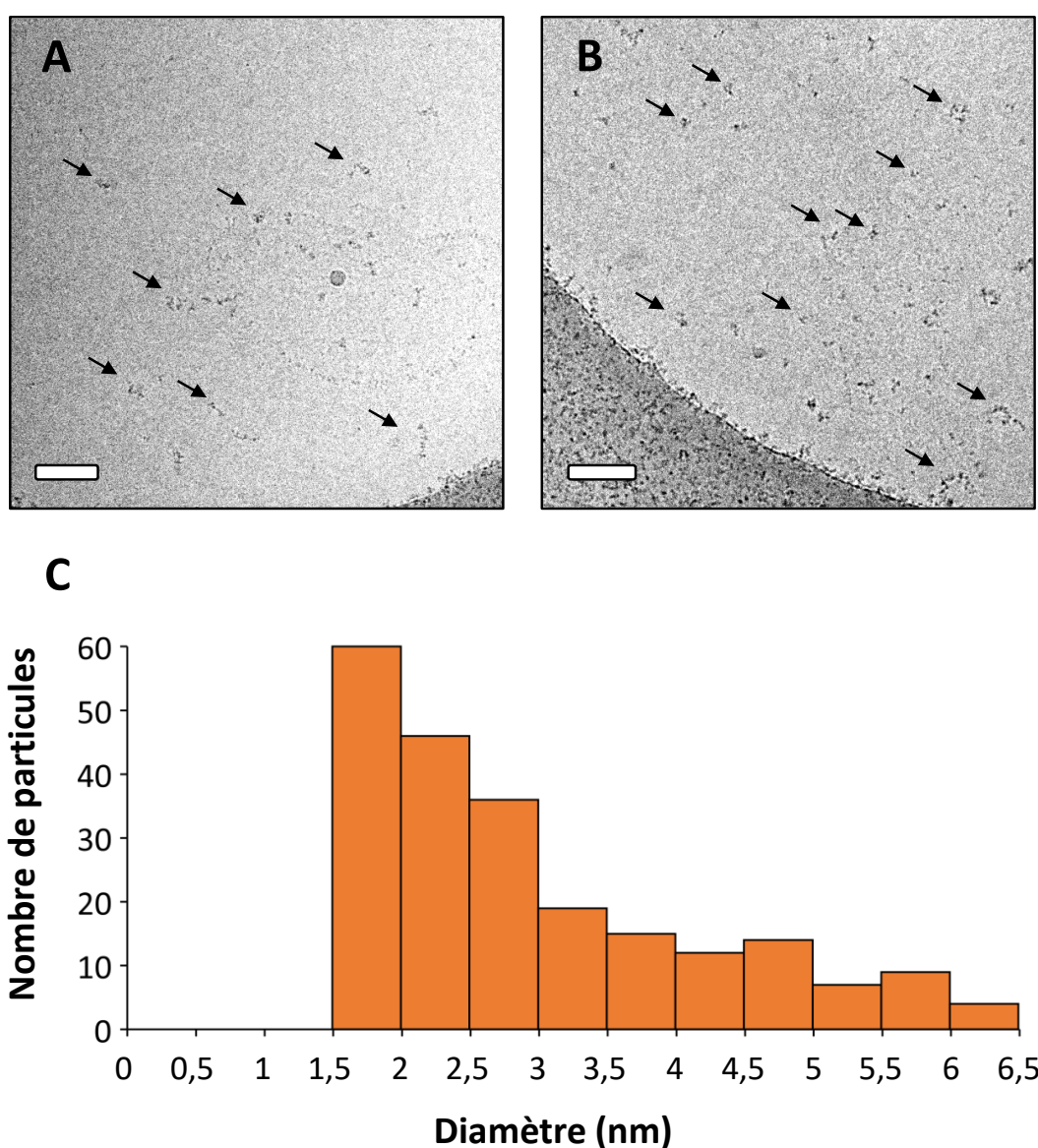


Figure 9 : (A), (B) Clichés cryo-TEM de P26 en présence d'acide polyaspartique (0,1 Asp/Ca²⁺) après 7 minutes de mélange. Echelle = 100 nm. Les PNS sont montrées par des flèches pour plus de clarté. (C) Histogramme de la taille des clusters (sur l'ensemble des clichés).

Après 1h30, lorsque la solution devient initialement trouble sans pour autant observer de variations de concentration en Ca^{2+} (nucléation apparente, Figure 8D), nous notons la présence d'agrégats ramifiés (Figure 10A). En toute logique, ces réseaux ramifiés se formeraient à partir des PNS précédemment observés. Nous avons déjà observé plusieurs fois ce type de morphologies dans des conditions sans pAsp (voir Chapitre III). Nous avons attribué leur présence à la formation de clusters de postnucléation composant la phase de CAP_1 en coexistence avec les clusters de prénucléation lorsque les conditions initiales de concentration, de pH ou de force ionique étaient favorables à la formation directe de CAP_1 . Néanmoins, nous ajoutons que la longueur de leur réseau était limitée à des tailles submicrométriques et leur présence était éphémère car ils évoluaient rapidement en sphères d'environ 100 nm en taille. Cependant, en présence de pAsp, ces phases sont stables pendant plusieurs dizaines de minutes et la taille des réseaux formés peut atteindre plusieurs microns (Figure 10B, C). Nous proposons donc que le polymère stabilise cette phase déjà présente de manière éphémère dans des systèmes inorganiques. Ce comportement a par ailleurs déjà été observé dans la stabilisation d'une phase de liquide dense par pAsp intervenant dans la précipitation de CaCO_3 , un système dont le mécanisme de nucléation est aussi non-classique³⁸.

Il est à noter qu'avant que ce type de phase n'ait été observé, il était supposé que l'acide polyaspartique induisait une phase de type PILP définie comme une phase de liquide dense pouvant infiltrer les fibrilles de collagène par capillarité¹⁰. Si dans le cas de CaCO_3 , des nano-gouttelettes riches en ions ont été observées, les rares observations de cette phase, dans le cas de l'hydroxyapatite, la décrivent plutôt comme un assemblage de nanoparticules amorphes solides, lesquelles pourraient être stabilisées en réseau par l'additif organique¹¹. Nos observations semblent donc en accord avec cette hypothèse, ainsi qu'en opposition avec la définition de PILP considérant une phase liquide.

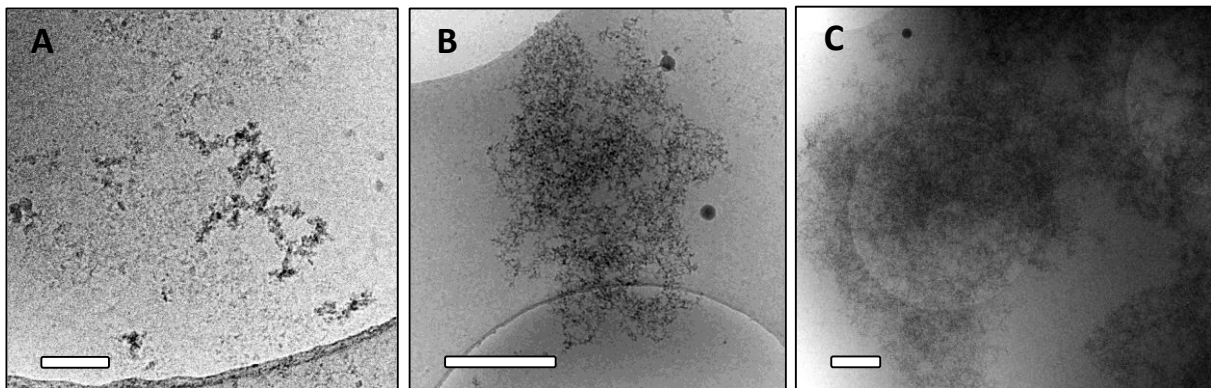


Figure 10 : Clichés cryo-TEM de P26 en présence d'acide polyaspartique (0,1 Asp/ Ca^{2+}) après 1h30 de mélange. Echelle = 100 nm (A), Echelle = 500 nm (B) (C).

Les observations décrites jusqu'à présent ne témoignent pas de grande différence par rapport au mécanisme observé en conditions purement inorganiques dans les chapitres précédents. Néanmoins, après 6 heures, nous observons des objets sphériques de taille nanométrique légèrement agrégés (Figure 11A, B). Ce type de réseau peut s'étendre sur des distances supérieures au micromètre (Figure 11C). Nous avons estimé la taille de ces objets comme comprises entre 5 et 12 nm de diamètre (Figure 11D). Ces images nous permettent d'établir avec certitude l'influence de pAsp sur le mécanisme de formation de ces phases. En effet, la phase obtenue après la nucléation en l'absence de

pAsp, CAP₁, se trouve être sous la forme d'agrégats sphériques bien plus volumineux ayant des tailles supérieures à 100 nm de diamètre. Si nous pouvons affirmer que ces derniers sont composés de clusters de postnucléation, la résolution de nos images ne permet pas de dire qu'il en est de même pour les agrégats obtenus en présence de pAsp.

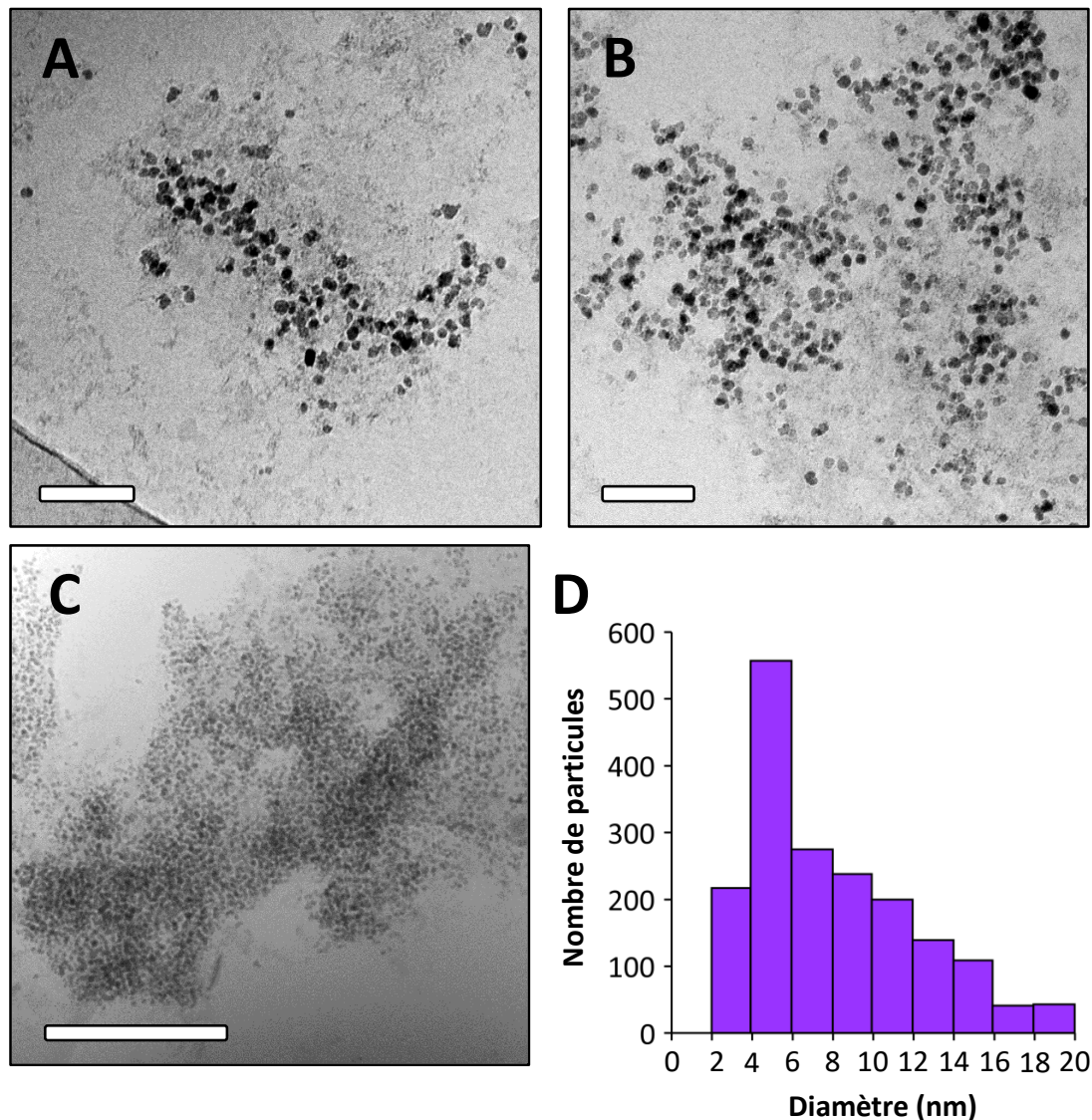


Figure 11 : Clichés cryo-TEM de P26 en présence d'acide polyaspartique (0,1 Asp/Ca²⁺) après 6 heures de mélange. Echelle = 100 nm (A) (B), Echelle = 500 nm (B) (C). Histogramme de la taille des agrégats sphériques (C).

Ces questionnements nous ont poussés à étudier une autre condition appelée P30 dont les paramètres de précipitation figurent dans le *Tableau 1*. En comparaison à P26, les conditions de précipitation de P30 sont favorables à une précipitation plus rapide, quasi-instantanée après mélange des solutions de phosphates et de calcium. Cela nous a permis d'augmenter la concentration en pAsp tout en obtenant une cinétique reproductible et relativement rapide. Malgré des conditions de concentration favorisant une précipitation rapide, nous remarquons que l'ajout de pAsp retarde grandement les événements de nucléation et de cristallisation survenant respectivement après 17

heures et 36 heures (Figure 12A). Sur la base de cette expérience de potentiométrie, nous observerons et analyserons par la suite les différentes phases en stoppant la cinétique à des moments choisis correspondants à :

- La prénucléation entre 0 et 17 heures.
- L'apparition d'ACP entre 24 et 37 heures.
- L'hydroxyapatite précipitée après 40 heures.

Comme on peut le constater sur la Figure 12A, une cinétique de plusieurs jours conduit à des mesures potentiométriques bruitées probablement dues à des variations de température et à l'évaporation des solutions électrolytes dans les électrodes. Les valeurs de $[Ca^{2+}]_{libre}$ et pH (non présentées ici) à long terme ne sont donc pas quantitativement exploitables, mais permettent tout de même la détection de 30% de calcium lié sous forme de PNS et de complexes de calcium.

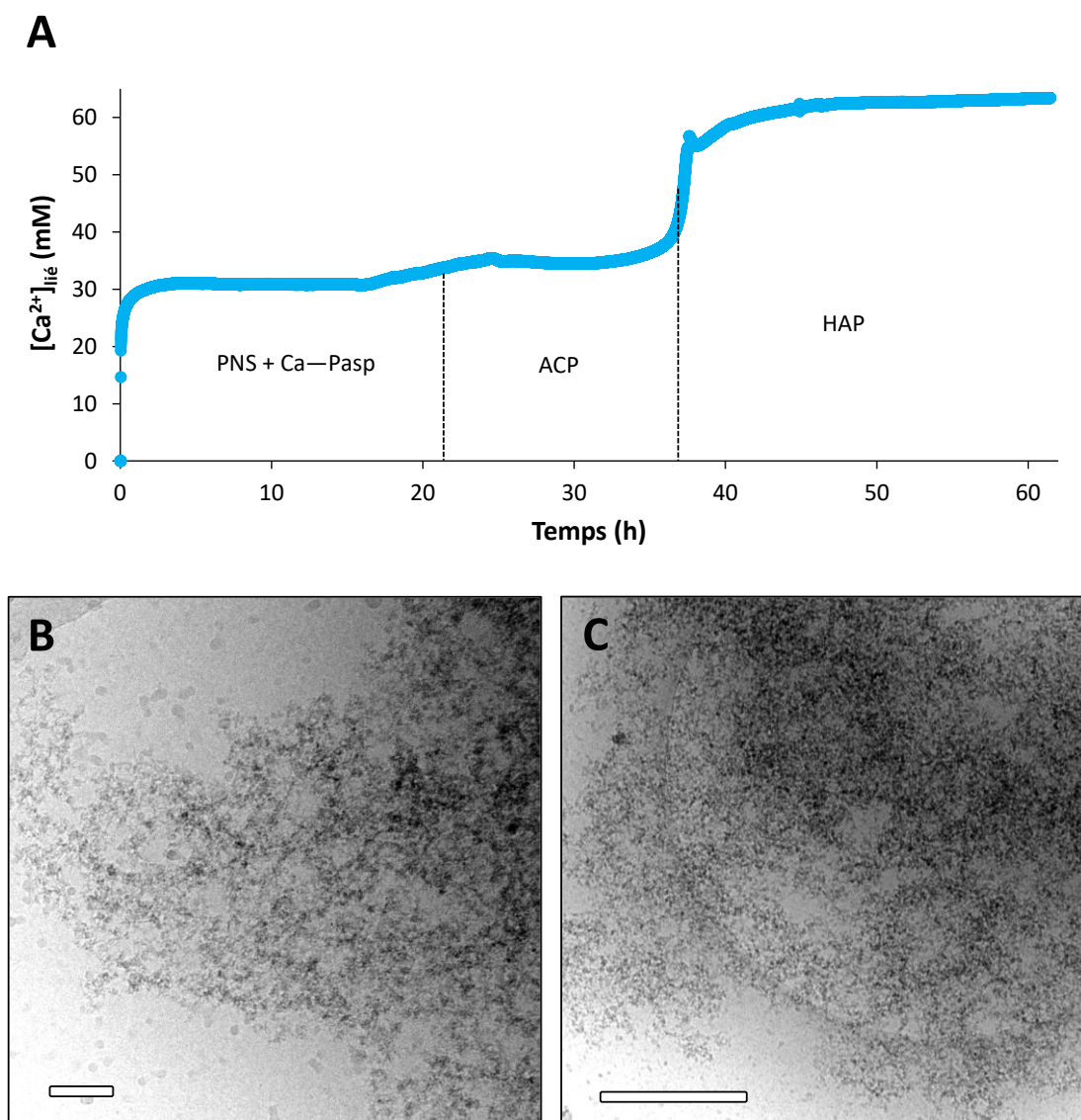


Figure 12 : (A) Détection des ions Ca^{2+} liés par potentiométrie calcium au cours de la précipitation de P30 en présence de 0,25 Asp/ Ca^{2+} . (B) (C) Clichés cryo-TEM de P30 en présence d'acide polyaspartique (0,25 Asp/ Ca^{2+}) après 20 heures de mélange. Echelle = 100 nm (A), Echelle = 500 nm (B).

Nous avons observé P30 par cryo-TEM 20 heures après le mélange initial *i.e.* après la nucléation. Les clichés sont présentés en (Figure 12B) et présentent des réseaux de nanoparticules très petites. Leur taille se situe aux alentours de la limite de détection de 2 nm de diamètre. Ces réseaux peuvent eux-aussi atteindre des tailles supérieures au micromètre (Figure 12C). Etrangement, ces réseaux ressemblent fortement à ceux rencontrés lors de la précipitation apparente en Figure 10. Les différences de taille des nanoparticules pourraient être dues à la concentration relative en résidu Asp/Ca²⁺. La comparaison des différents agrégats obtenus après la nucléation effective en l'absence et en présence de 2 concentrations relatives en résidu Asp/Ca²⁺ est présentée en Figure 13. En l'absence de pAsp, les agrégats de CAP₁ ont une taille proche des 100 nm de diamètre (Figure 13A). Avec 0,1 Asp/Ca²⁺, la taille a précédemment été estimée entre 5 et 12 nm de diamètre (Figure 13B). Enfin, avec 0,25 Asp/Ca²⁺, la taille des particules est inférieure ou égale à 2 nm de diamètre (Figure 13C). Ces résultats expliquent la stabilisation de cette phase de type PILP par l'acide polyaspartique. En effet, nous observons que plus la quantité de pAsp est importante en solution, plus il pourrait exercer son action inhibitrice.

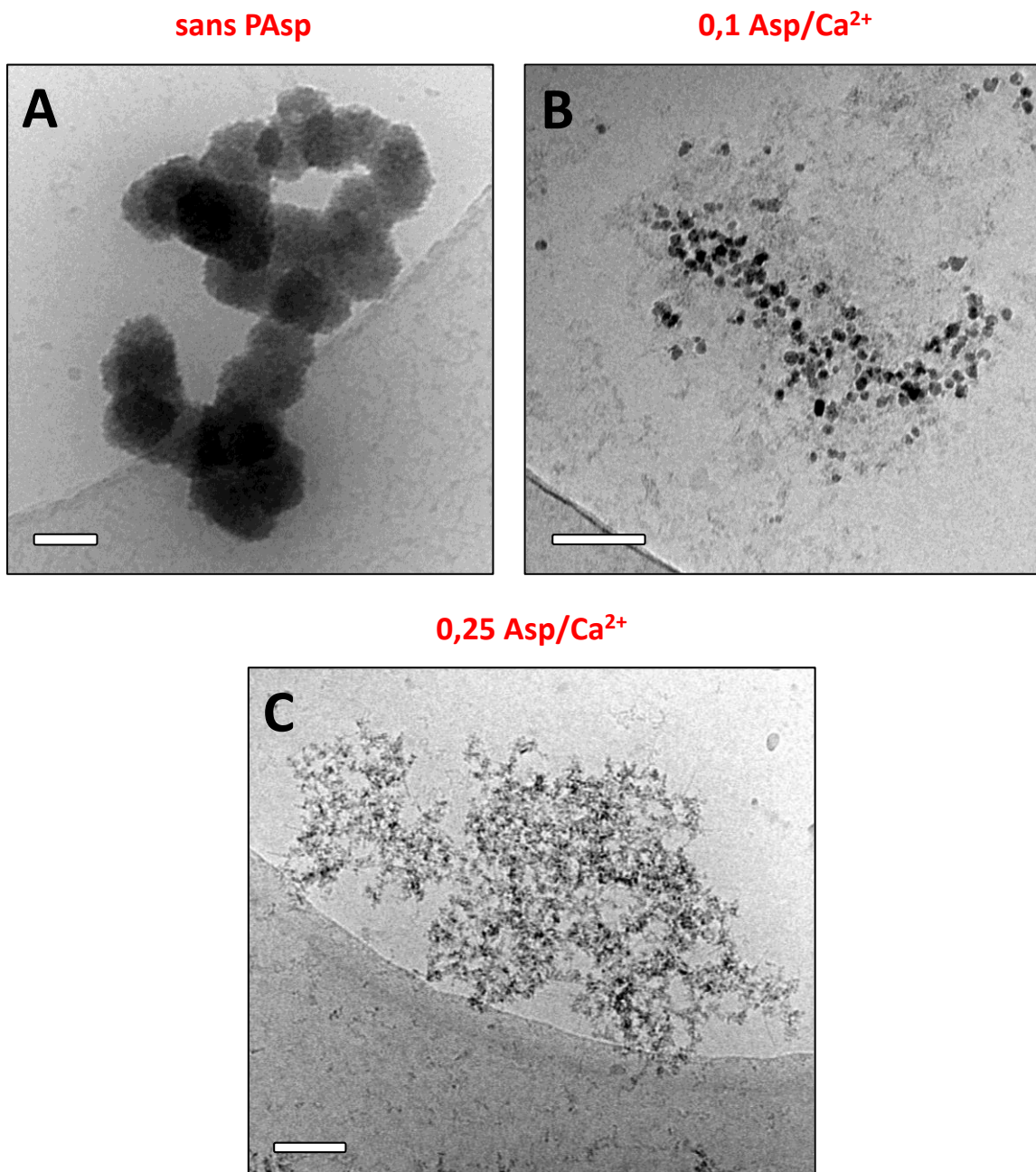


Figure 13: Clichés cryo-TEM des agrégats de postnucléation de (A) P26 sans acide polyaspartique, (B) de P26 en présence de pAsp (0,1 Asp/Ca²⁺) après 6 heures de mélange et de (C) P30 en présence de pAsp (0,25 Asp/Ca²⁺) après 20 heures de mélange. Echelle = 100 nm.

La taille très étendue des réseaux présentés (> μm) dans ce chapitre dépasse de loin toutes nos observations en conditions purement inorganiques (≈ 200 nm). Cet autre argument suggère que la présence de pAsp pourrait stabiliser les agrégats de postnucléation en promouvant des réseaux longs de nanoparticules tout en réduisant leur état d'agrégation. Concernant la fin de cette étude, ces réseaux seront dorénavant appelés « réseaux de nanoparticules » au détriment des appellations *i)* « PILP » que nous trouvons inappropriée et *ii)* « agrégats de postnucléation » considérant les clusters solides formant CAP₁ en conditions purement inorganiques.

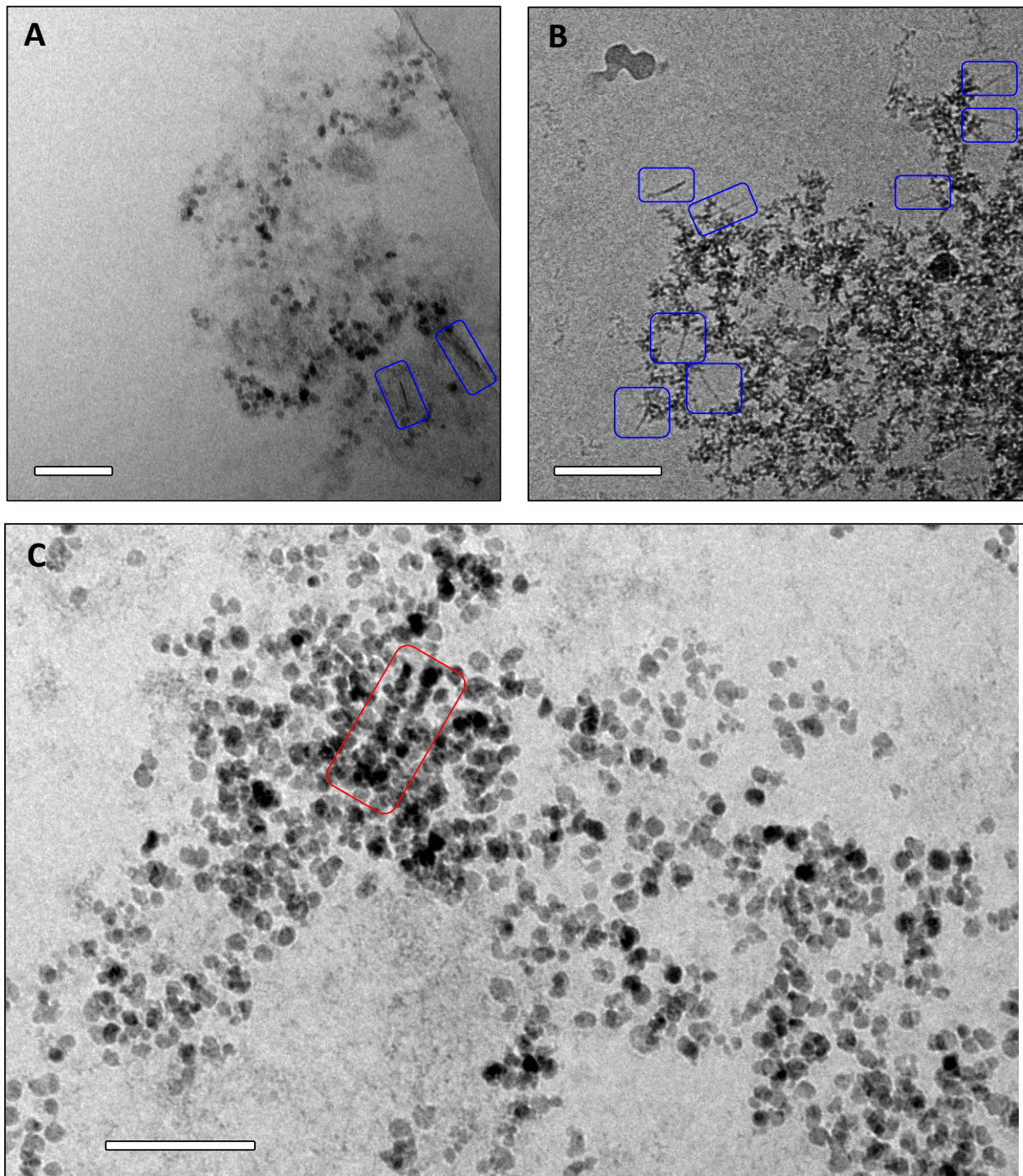


Figure 14 : Clichés cryo-TEM de (A)(C) de P26 en présence de pAsp ($0,1 \text{ Asp}/\text{Ca}^{2+}$) après 6 heures de mélange et de (B) P30 en présence de pAsp ($0,25 \text{ Asp}/\text{Ca}^{2+}$) après 24 heures de mélange. Echelle = 100 nm. Les nano-bâtonnets supposés être de l'HAP sont entourés en bleu et l'alignement localisé de particules sphériques est entouré en rouge.

La fin de l'analyse du mécanisme modifié en présence d'acide polyaspartique est maintenant portée sur les 2 conditions de précipitation P26 et P30 en présence de $0,1 \text{ Asp}/\text{Ca}^{2+}$ et de $0,25 \text{ Asp}/\text{Ca}^{2+}$, respectivement. Dans ces 2 cas, le passage par deux phases intermédiaires de type CAP_1 vers CAP_2 n'a pas été observée. Néanmoins, des observations par cryo-TEM dans les instants précédant la cristallisation en HAP ont pu être capturés respectivement 6 heures et 24 heures après mélange. Dans les 2 conditions, nous avons pu observer la formation de plaquettes en coexistence avec les réseaux

de nanoparticules (entourées en bleu dans les Figure 14A, B). Ces plaquettes semblent isolées et ont une taille variant de 30 à 100 nm de long. La cristallisation d'HAP à partir de nanoparticules sphériques a déjà été observée en présence d'acide polyaspartique par Krogstad *et al.* dans la littérature¹⁵. Notre système est relativement similaire au leur, à la différence qu'eux ont utilisé des concentrations en calcium, phosphates et pAsp bien supérieures aux nôtres. De manière analogue, nous observons parfois un alignement localisé des particules sphériques (entourées en rouge dans la Figure 14C). Néanmoins, nous ne pouvons pas conclure si cet attachement des particules est bel et bien orienté ou s'il est aléatoire.

Enfin, les clichés de cryo-TEM des phases finales obtenues en l'absence (24h après mélange) ou en présence de pAsp (48h après mélange) sont présentés en Figure 15. Dans les trois cas, nous observons des plaquettes dont les longueurs semblent être similaires et comprises entre 50 et 200 nm. Nous observons toutefois que la largeur des plaquettes semble diminuer avec la quantité d'Asp/Ca²⁺, passant de 30 à 50 nm sans pAsp (Figure 15A), à 20—30 nm (Figure 15B) et 10—15 nm (Figure 15C) en présence de respectivement 0,1 et 0,25 Asp/Ca²⁺. Ainsi, ces observations nous permettent de conclure que :

- La phase finale semble être la même. Nous montrons plus loin, par RMN du solide, que cette phase est bien de l'HAP.
- La morphologie de la phase finale semble changer avec la quantité de pAsp, passant de plaquettes « larges » à des plaquettes moins larges tendant à former des bâtonnets.

Dans cette partie, nous avons étudié l'influence de la quantité relative de pAsp par rapport à la concentration en calcium initiale. Nous avons notamment été témoins de son action inhibitrice sur la nucléation et la cristallisation probablement lié au changement de mécanisme que nous observons. Ces différences suggèrent que l'acide polyaspartique est en interaction dans toutes les phases en présence, de la prénucléation à la cristallisation. La prochaine partie est donc dédiée à l'étude de ces potentielles interactions organo-minérales.

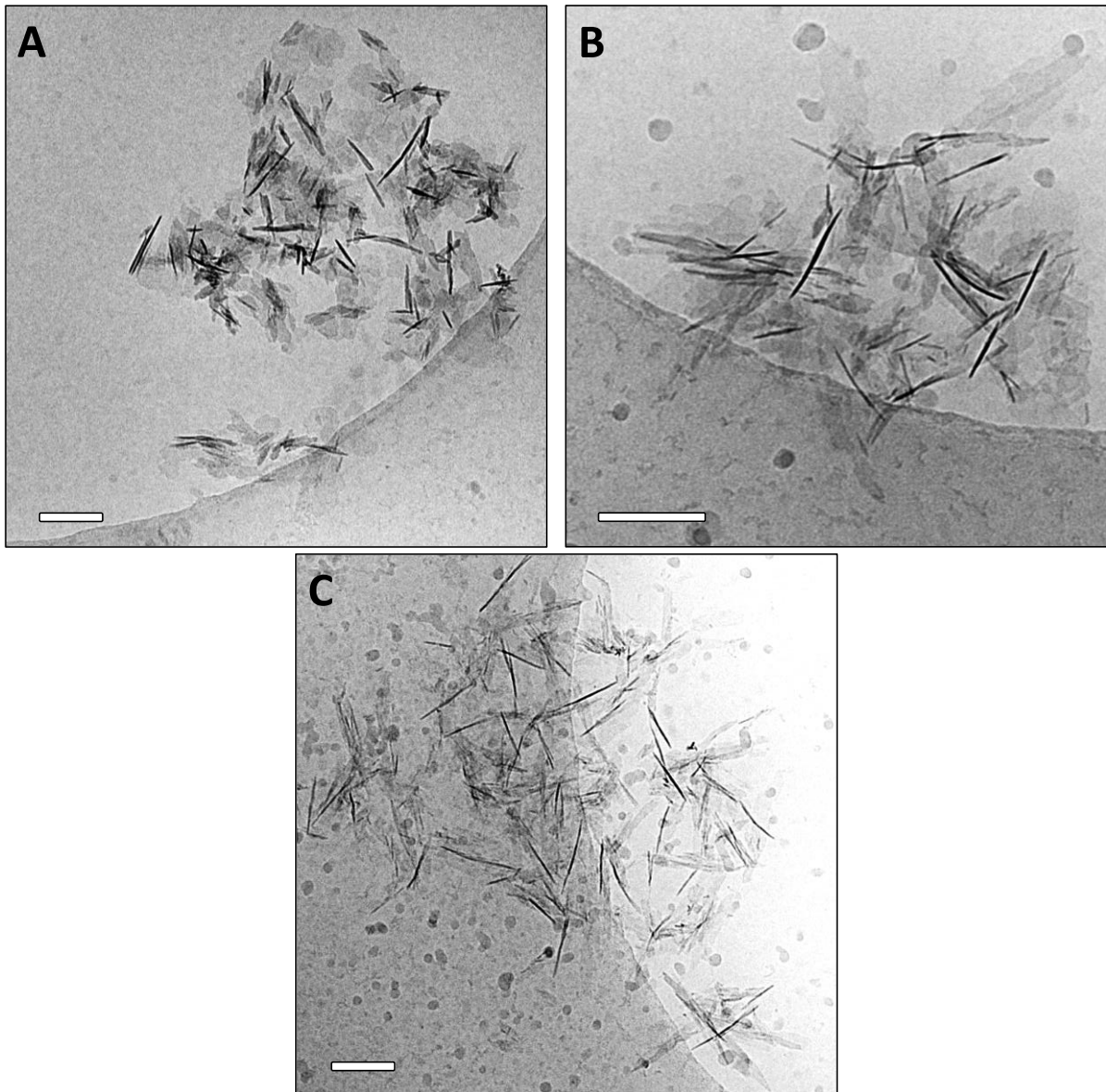


Figure 15 : Clichés cryo-TEM des plaquettes d'HAP dans (A) P26 sans acide polyaspartique après 24h de mélange, (B) de P26 en présence de pAsp (0,1 Asp/Ca²⁺) après 48 heures de mélange et de (C) P30 en présence de pAsp (0,25 Asp/Ca²⁺) après 48 heures de mélange. Echelle = 100 nm.

V. Les interactions avec l'acide polyaspartique

Si nos résultats suggèrent fortement des interactions de l'acide polyaspartique à tous les niveaux de la prénucléation et la cristallisation d'HAP, encore faut-il le prouver. Dans ce dernier chapitre, nous combinons des expériences de RMN en solution, de RMN à l'état solide et de MAS-DNP sur solutions vitrifiées pour avérer l'existence de ces interactions. La composition moyenne élémentaire de la phase solide présente dans les réseaux de nanoparticules amorphes sera notamment discutée.

1) La prénucléation

De manière générale, il n'est pas trivial d'étudier la structure des PNS du fait de leurs caractéristiques dynamique, nanométrique et soluble. Leur étude est d'autant plus compliquée que l'acide polyaspartique est aussi présent et représente un paramètre supplémentaire à étudier. Rien n'indique que la structure proposée dans les chapitres III et V est la même avec l'addition d'un additif organique pouvant complexer les ions calcium. De même, rien n'indique que les ions Ca^{2+} soient complexés par 6 résidus d'acide aspartique en présence d'ions phosphates qui ont aussi la possibilité d'interagir avec les ions Ca^{2+} .

L'objectif premier de cette sous-partie est de vérifier expérimentalement qu'il y a bien une interaction spécifique entre l'acide polyaspartique et les espèces de prénucléation. Pour cela, nous avons premièrement utilisé la méthodologie de la MAS-DNP sur solution vitrifiée décrite dans le chapitre V. Comme pour le cryo-TEM, la condition de précipitation P30 a été initiée par mélange en présence de 0,25 Asp/ Ca^{2+} puis vitrifiée après quelques minutes de réaction. Pour cela, la solution a été transférée dans un rotor qui a lui-même été introduit dans la sonde thermostatée à 100K. Le spectre ^{31}P CPMAS correspondant est présenté en Figure 16A. Précisons que dans cette partie, nous avons utilisé un acide polyaspartique enrichi en ^{13}C sur les fonctions acides et amines seulement. Le spectre a été enregistré à une fréquence de rotation de 8 kHz ce qui rend moins prononcée l'intensité des bandes de rotation caractéristique de son anisotropie de déplacement chimique. En comparaison, le spectre présenté en Figure 16B est celui d'une solution de phosphate contenant du pAsp au même pH, mais sans ions calcium. Nous remarquons que les déplacements chimiques semblent être similaires dans les 2 cas. Nous notifions aussi de faibles différences d'intensité sur les bandes de rotation, celles sans ions calcium étant plus intenses. Comme vu au chapitre V, nous aurions pu exploiter les paramètres CSA pour déterminer la composition des PNS en présence de pAsp. Toutefois, par manque de temps, nous n'avons pas enregistré de spectres à basse vitesse permettant d'obtenir plus de bandes de rotation. Par ailleurs, ce type d'analyse nécessite de connaître la fraction de calcium lié sous formes de PNS, donnée que nous n'avons pas pu estimer par potentiométrie calcium, car la mesure inclut aussi les complexes de pAsp.

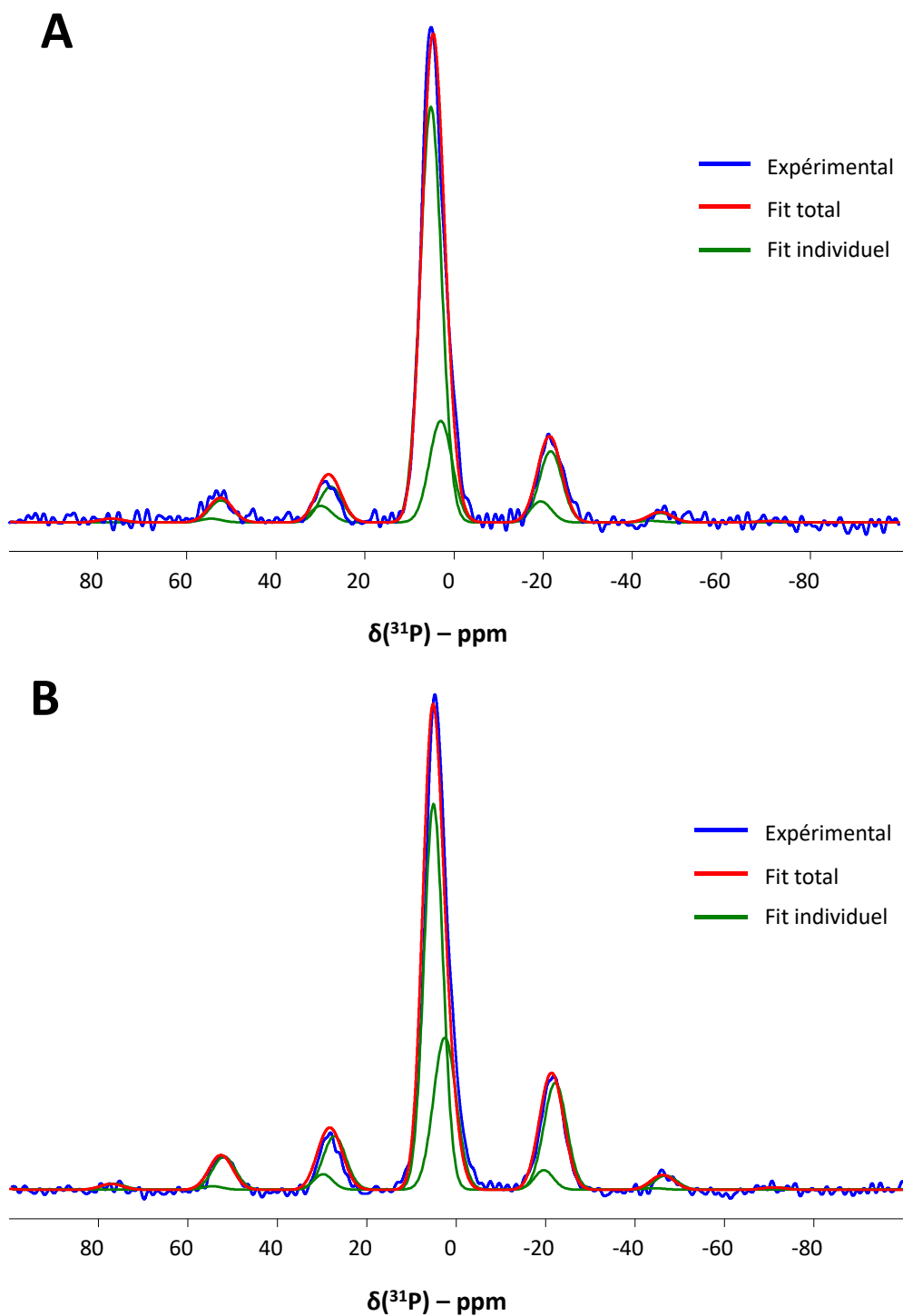


Figure 16 : Spectres ^{31}P CP DNP MAS de (A) la solution de phosphates de calcium P30 en présence de $0,25 \text{ Asp}/\text{Ca}^{2+}$ après 10 minutes de mélange et (B) de la solution de phosphate pure à pH 7,4. Temps de contact = 1 ms.

L'interaction de pAsp avec les PNS a été étudiée en utilisant la séquence REDOR. Cette dernière est habituellement utilisée pour déterminer des distances interatomiques entre 2 noyaux différents. Dans notre cas, l'analyse a consisté en une comparaison de deux spectres ^{13}C CPMAS respectivement enregistrés avec et sans une irradiation ^{31}P . Les signaux déphasés témoignent ainsi d'un couplage dipolaire $^{13}\text{C}-^{31}\text{P}$ ce qui indique une proximité spatiale. L'expérience est présentée en Figure 17. Le

signal d'intérêt, pointé par une flèche, correspond aux groupements COO^- et CONH de l'acide polyaspartique entre 160 et 180 ppm. Nous remarquons qu'au terme de l'expérience REDOR, seul le signal d'intérêt déphase ce qui signifie que l'acide polyaspartique est à proximité d'ions phosphates, suggérant une interaction spécifique avec les PNC. Nous supposons ici que la proximité est avec des phosphates présents dans les clusters de prénucléation, car les ions Ca^{2+} aussi présents ont la capacité d'être complexé par pAsp. De plus, nous n'observons pas de déphasage correspondant aux signaux du glycérol ce qui suggère que ce dernier n'interagit pas particulièrement avec les PNS/phosphates et donc n'entre pas en jeu dans le processus de prénucléation.

L'analyse REDOR permettant de calculer des distances interatomiques se base sur l'acquisition de plusieurs spectres avec ou sans différents temps d'irradiation. Ici, nous n'avons enregistré que deux spectres (avec ou sans irradiation) dans l'objectif de déterminer s'il y avait interaction entre les ions phosphates et le pAsp. De plus, même avec le gain de sensibilité conféré par la DNP et l'usage de pAsp enrichi en ^{13}C , cette expérience s'est avérée longue et l'enregistrement de plusieurs spectres à différents temps d'irradiation aurait été très couteuse en temps.

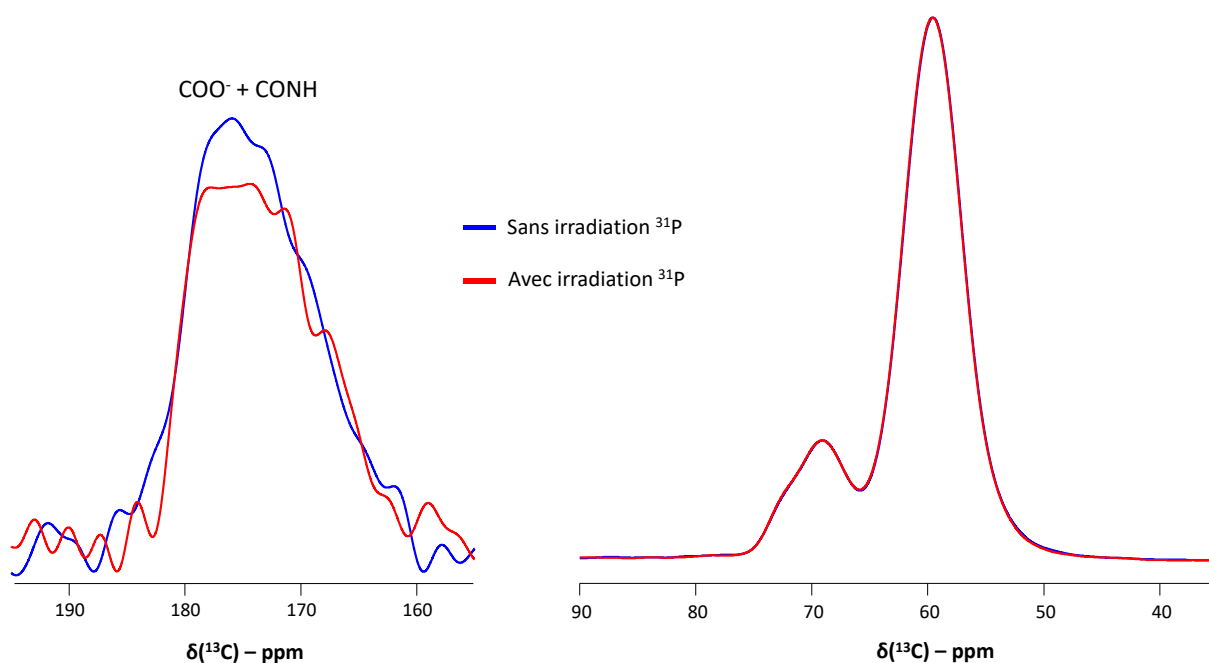


Figure 17 : Spectre ^{13}C CP REDOR $\{^{31}\text{P}\}$ avec et sans irradiation ^{31}P , de la solution de phosphate de calcium P30 en présence de 0,25 Asp/ Ca^{2+} vitrifiée après 10 minutes de mélange. Les spectres avec et sans irradiation sont respectivement en rouge et en bleu. Temps d'irradiation = 8 ms. Temps de contact = 1 ms. Gauche = région des fonctions carboxylées de pAsp. Droite = Signaux du glycérol.

Nous avons précédemment vu que la complexation du Ca^{2+} par le pAsp impactait la largeur des signaux RMN du noyau ^{43}Ca en solution et donc la dynamique des ions Ca^{2+} . De la même manière, la précipitation de P30 en présence de 0,25 Asp/ Ca^{2+} a été suivie par RMN du ^{43}Ca en solution *in situ*. Les spectres correspondants à la fenêtre temporelle de la prénucléation sont montrés en Figure 18A.

On remarque que ces derniers sont plus larges ($\approx 0,9$ ppm) que ce qui était attendu pour 0,25 Asp/ Ca^{2+} en l'absence de phosphate (0,2 ppm) (Figure 7B). La largeur des signaux étant reliées à la dynamique, nous avons conclu que le calcium complexé était moins mobile car lié à des chaînes rigides de pAsp. Ces différences montrent que les espèces de prénucléation en présence de pAsp semblent

elles-aussi être complexées de manière rigide. Cela est d'autant plus curieux que seul 30% du calcium total est lié sous la forme d'espèces de prénucléation et de complexes de pAsp (Figure 12A). Etant donné le régime d'échange rapide, la largeur observée est une moyenne pondérée entre le signal correspondant à 70% d'ions libres et le signal des espèces liées. Dans le régime sans phosphates cela correspondrait à une concentration de 0,18 Asp/Ca²⁺ soit à un signal moyen ayant une largeur inférieure à 0,2 ppm (Figure 7B). Ce n'est ici pas le cas ce qui suggère que les calciums liés sous formes d'espèces de prénucléation seraient aussi en interaction avec les chaînes de pAsp et ainsi qu'une interaction spécifique a lieu à ce stade de la prénucléation. Faute d'un S/N relativement faible, nous n'avons pas été plus loin dans l'analyse.

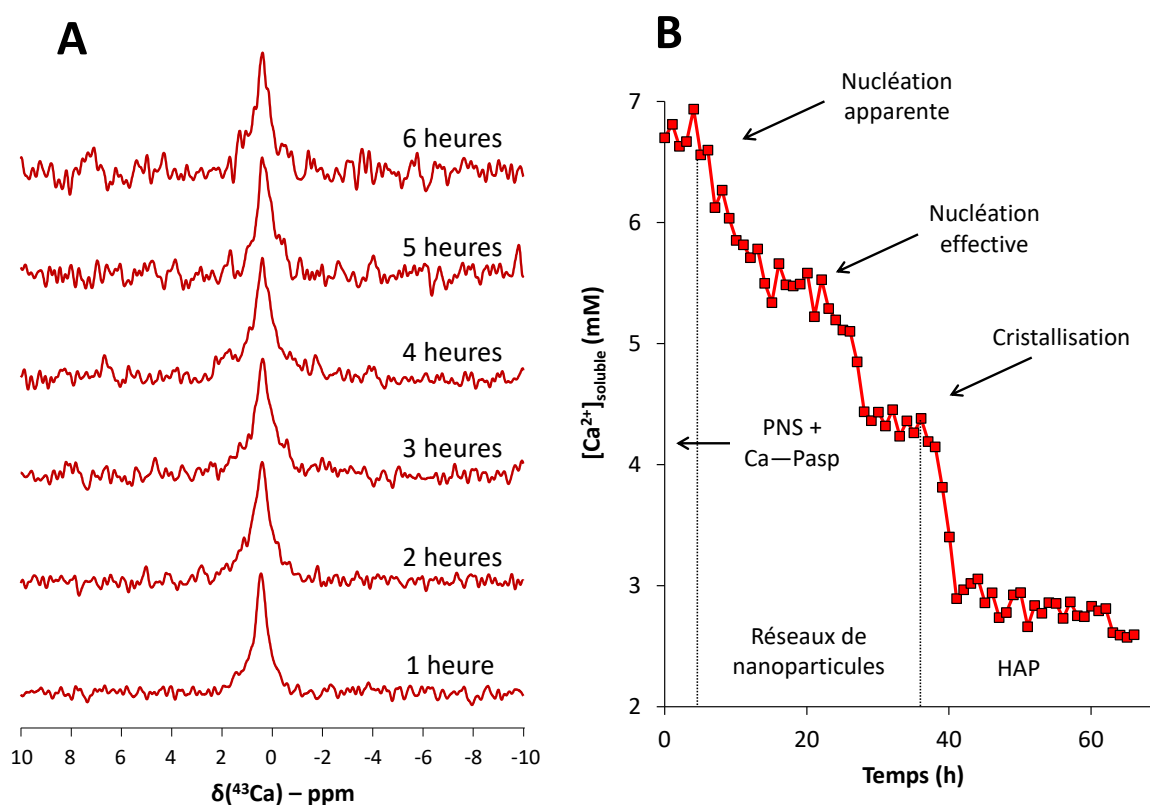


Figure 18 : (A) Spectres ⁴³Ca de P30 avec 0,25 Asp/Ca²⁺ obtenus les 6 premières heures suivant le mélange initial des solutions correspondant à la phase de prénucléation. (B) Profil de la concentration en ions calcium soluble obtenu par intégration. Résolution temporelle = 1 heure.

2) Les réseaux de nanoparticules

Nous avons prouvé expérimentalement que les espèces de prénucléation étaient en interaction avec l'acide polyaspartique. La phase nucléant de ces dernières est un cluster nanométrique dont le diamètre est inférieur à 2 nm. Ces clusters solides s'agrègent sous la forme de sphères arrangées en réseau pouvant atteindre plusieurs micromètres en taille, celui-ci étant probablement induit par l'interaction des chaînes de pAsp avec la phase minérale.

Reprenons l'analyse de P30 en présence de 0,25 Asp/Ca²⁺ avec le suivi de la précipitation par RMN ⁴³Ca en solution tout au long de la réaction de minéralisation (jusqu'à t = 60h). Nous n'avons pas

observé de variations significatives du déplacement chimique et de la largeur des signaux au cours du temps. L'intégration des signaux a permis de calculer la consommation des ions Ca^{2+} au cours de la précipitation. Précisons que la concentration détectée est celle des ions calcium solubles, ce qui nous permet de calculer indirectement la concentration en calcium lié en phase solide. Les résultats sont consignés en Figure 18B. Le profil de consommation ionique semble décroître de manière plus abrupte après 7, 26 et 37 heures. Les différences de cinétique (parfois plus rapide, parfois plus lent) par rapport à la potentiométrie calcium (Figure 12A) s'expliquent probablement par l'absence d'agitation dans le tube RMN. Néanmoins, ces passages d'un palier à un autre semblent correspondre respectivement à la nucléation apparente, la nucléation effective et la cristallisation. Après 37 heures, nous attribuons la baisse soudaine de la concentration en calcium libre à la cristallisation d'hydroxyapatite, car aucune autre variation n'a été détectée par la suite.

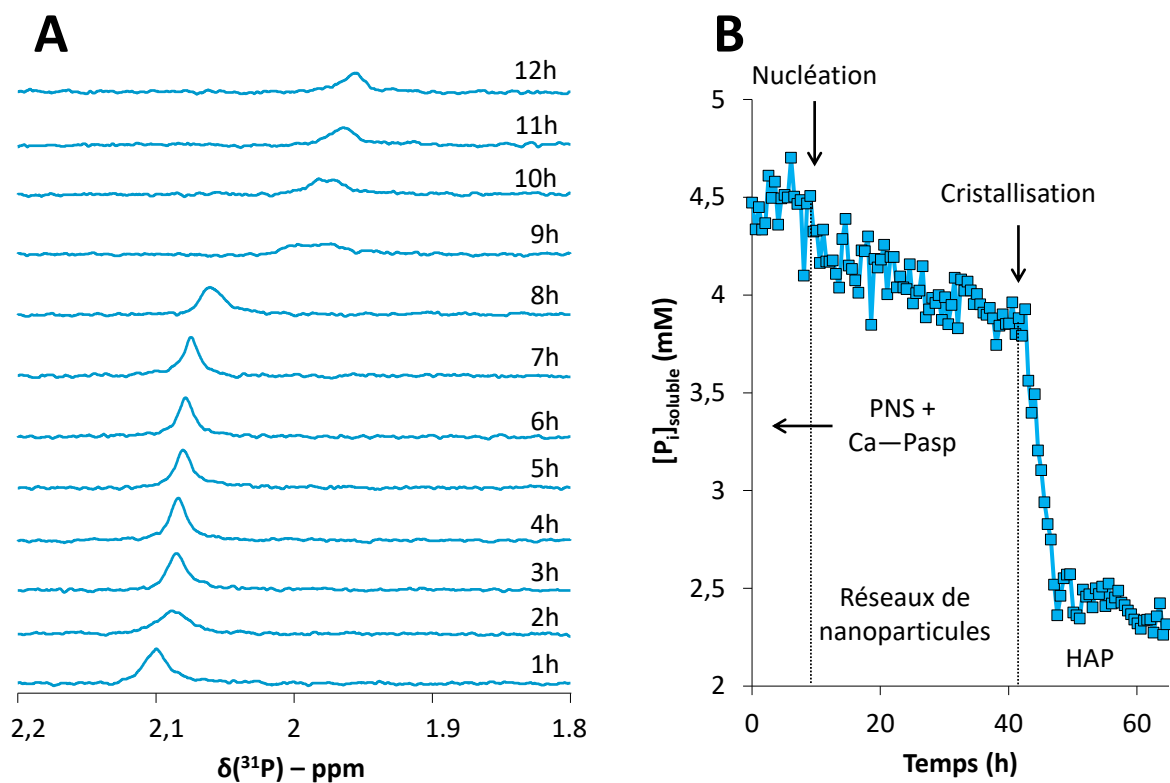


Figure 19 : (A) Spectres ^{31}P de P30 avec 0,25 Asp/ Ca^{2+} obtenus les 12 premières heures suivant le mélange initial des solutions. (B) Profil de la concentration en ions phosphates soluble obtenu par intégration. Résolution temporelle = 30 minutes.

De la même façon, nous avons suivi la concentration en ions phosphates par RMN ^{31}P en solution *in-situ*. L'allure des spectres obtenus est présentée en Figure 19A. L'intégration des signaux (Figure 19B) conduit à un profil de concentration en phosphates solubles similaire à celui observé pour les ions calcium. Si la cristallisation est repérée par une diminution drastique de la concentration en ions phosphates, la nucléation n'entraîne la précipitation que d'une faible quantité d'ions phosphates, repérée par une variation soudaine du déplacement chimique après 8h (Figure 19A). Nous en déduisons que nous sommes en présence d'un régime d'échange rapide entre les ions libres et les PNS avant la nucléation et que l'on observe seulement le signal des ions phosphates libres après la nucléation. Notons que la variation de la concentration en ions phosphates libres ne varie que

légèrement après la nucléation. Cela semble indiquer que la phase précipitée correspondant aux réseaux de nanoparticules ne contient que peu d'ions phosphates. Par ailleurs, ces faibles variations ne nous permettent pas de différencier les étapes de nucléation apparente et effective.

Enfin, les concentrations en pAsp, même enrichis en ^{13}C étaient trop faibles pour obtenir un SNR suffisant tout en ayant une bonne résolution temporelle entre les spectres. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers un suivi de la concentration en pAsp par RMN ^1H en solution *in-situ* suivant la même méthodologie. L'objectif était de déterminer si de l'acide polyaspartique précipitait avec les nanoparticules amorphes et, si c'était le cas, de quantifier ses proportions dans la structure solide. Les premiers spectres issus de l'analyse quantitative sont présentés en Figure 20A et ressemblent fortement au signal du pAsp pur dans les mêmes conditions de pH et de température. Le signal observé était celui correspondant aux groupements méthylène CH_2 , d'après Wolk *et al.*³⁹. En effet, les signaux correspondants aux groupements CONH sont des protons échangeables donc très larges et difficiles à quantifier, alors que les groupements COO^- sont déprotonés (donc non détectables par RMN ^1H) et les groupements CH sont proches du signal de l'eau en termes de déplacement chimiques, lequel a été supprimé par présaturation.

Le profil de concentration en pAsp a donc été obtenu par intégration du signal des méthylènes et est présenté en Figure 20B. Précisons que la concentration étudiée ici est celle des résidus d'acide aspartique. La concentration relative en pAsp étant $0,25 \text{ Asp}/\text{Ca}^{2+}$, nous en déduisons que la concentration initiale en résidu d'acides aspartiques est de $1,68 \text{ mM}$. La nucléation apparente est bien visible et se traduit par une baisse soudaine de la concentration en pAsp après 4 heures, ce qui signifie que pAsp précipite avec les réseaux de nanoparticules amorphes et fait bien partie intégrante de leur structure. Nous supposons que la deuxième décroissance brusque de concentration (après 33h) correspond à la nucléation effective. Nous attribuons ces décroissances respectives aux étapes de nucléation apparente et effective. D'autre part, nous remarquons qu'après 49 heures d'acquisition, la concentration en pAsp soluble se met à augmenter de manière concordante avec la cristallisation en HAP. Cela signifie qu'une partie de l'acide polyaspartique retourne en solution après la formation d'HAP et suggère donc que pAsp ne stabilise plus, ou moins, cette phase inorganique.

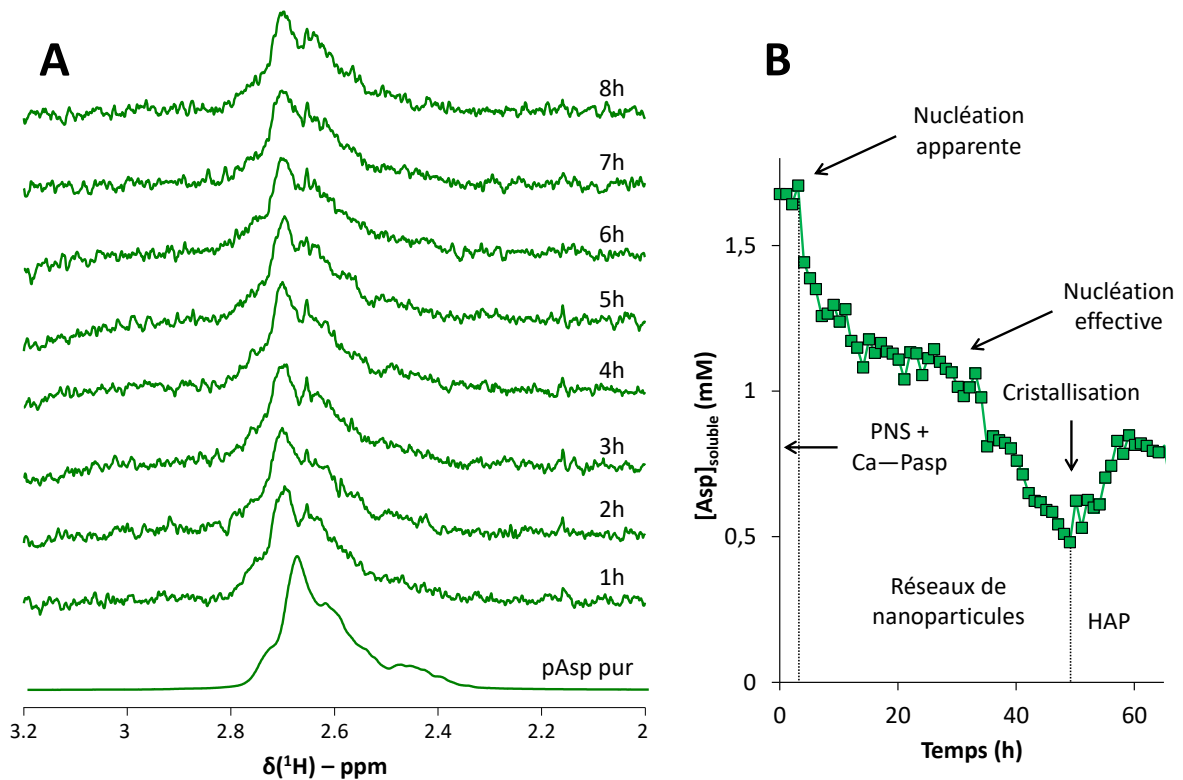


Figure 20 : Spectres ^1H de P30 avec 0,25 Asp/ Ca^{2+} obtenus les 8 premières heures suivant le mélange initial des solutions. (B) Profil de la concentration en pAsp soluble obtenu par intégration. Résolution temporelle = 1 heure.

L'analyse quantitative de la consommation des ions Ca^{2+} , phosphates et résidus d'acide aspartique contenus dans l'acide polyaspartique a permis de calculer leur proportion dans la structure intermédiaire contenant les réseaux de nanoparticules. Précisons que les cinétiques de précipitation dans le spectromètre diffèrent les unes des autres, ainsi qu'avec celles déterminées par potentiométrie calcium. Nous supposons que ces différences de cinétique sont liées à l'absence d'agitation dans le tube RMN. Ainsi, les temps de nucléation ont été artificiellement coordonnés après 8 heures, correspondant au temps de nucléation le plus long observé en RMN ^{31}P et les rapports Ca/P et P/Asp ont été calculés. Les résultats sont présentés en Figure 21.

La première grandeur calculée est le rapport Ca/P, qui est largement utilisé pour décrire la structure des différentes phases de phosphates de calcium (Figure 21A). Cette figure ne considère pas l'étape de prénucléation, car nous n'avons pas pu déterminer avec précision la quantité d'ions Ca^{2+} liés sous formes de PNS par potentiométrie du calcium, la mesure prenant aussi en compte les complexes liés à pAsp. Ainsi, la figure ne présente que le rapport Ca/P déterminé pour les phases solides. Avant 42 heures, correspondant aux réseaux de nanoparticules observées pendant les nucléation apparentes et effectives, nous observons une valeur oscillant autour de 3-4, contre 0,67 pour CAP_1 en conditions purement inorganiques. Cela pourrait être expliqué par un remplacement des anions phosphates par les chaînes négatives de pAsp dans la structure. Après 42h, on remarque ensuite que le rapport Ca/P descend autour de 1,8 ce qui semble confirmer la cristallisation d'hydroxyapatite. En effet, l'hydroxyapatite stœchiométrique a un rapport Ca/P de 1,67. Les hydroxyapatites biologiques ou biomimétiques ont plutôt un rapport Ca/P de 1,5, ceci étant dû aux substitutions ioniques qui entraînent des lacunes de Ca^{2+} , ainsi qu'à la présence d'une couche de surface amorphe. Dans notre

cas, les réseaux de nanoparticules présentent un rapport Ca/P élevé et pourraient encore être présent en solution après la cristallisation d'HAP, ce qui expliquerait un rapport Ca/P moyen supérieur à 1,5.

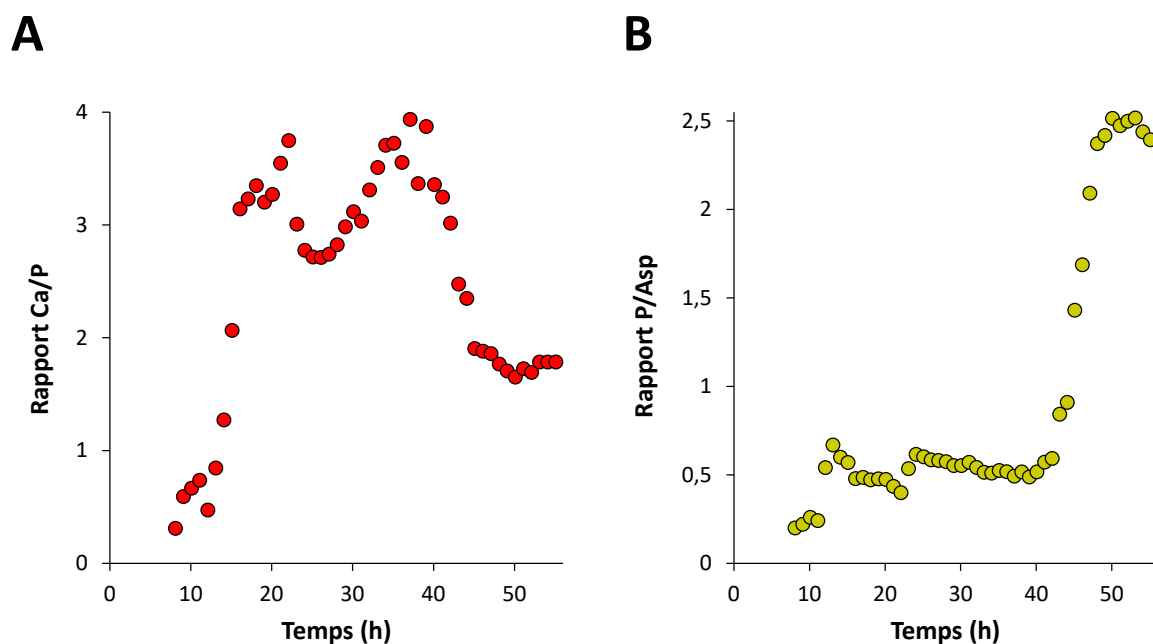


Figure 21 : Calculs des rapports (A) Ca/P et (B) P/Asp au cours de la précipitation de P30 en présence de 0,25 Asp/Ca²⁺. Résolution temporelle = 1 heure.

Parallèlement, nous avons calculé les proportions relatives des ions phosphates et de l'acide polyaspartique dans la structure (Figure 21B). La fenêtre temporelle correspondant aux réseaux de nanoparticules se situerait entre 8 et 42 heures et correspondrait à un rapport P/Asp assez stable de ~0,5. Cela signifie qu'il y aurait deux fois plus de résidus Asp que d'ions phosphates dans cette phase. Cela rappelle la structure de CAP-1 (Chapitre VI) dans laquelle 2 ions phosphates auraient été remplacés par des résidus aspartate. En combinant les précédents résultats, nous déterminons que les réseaux de nanoparticules sont composés d'objets dont la multiplicité correspondrait à 3 ions calcium liés à un phosphate et à 2 résidus d'acide aspartique appartenant à des chaînes d'acide polyaspartique.

De manière intéressante, nous n'observons pas de différences significatives dans les valeurs de Ca/P et P/Asp déterminées pendant la nucléation apparente (entre 8 et 30 heures) et la nucléation effective, ce qui suggère que les phases détectées sont belles et bien les mêmes.

Pour déterminer l'état de protonation des phosphates liés, nous avons réitéré l'approche utilisée dans le chapitre VI consistant à combiner les mesures potentiométriques du pH et la consommation en ions phosphates au cours de la précipitation. Néanmoins, nous n'avons pas pu déterminer précisément la variation du pH dans cette condition, car la cinétique d'évolution est trop lente pour obtenir des mesures potentiométriques fiables. Ainsi, la spéciation des ions phosphates a été estimée sur la condition P26 en présence de 0,05 Asp/Ca²⁺. La variation de pH associée est présentée en Figure 22A. Les variations de pH témoignent de relargage protonique en solution lorsque l'ACP et HAP apparaissent. Il est peu probable que les variations de pH soient induites par une déprotonation de l'acide polyaspartique dans cette gamme de pH ($pK_a < 4$)⁴⁰. Nous en déduisons ainsi que la variation du pH est gouvernée par la déprotonation des ions phosphates liés au cours du temps.

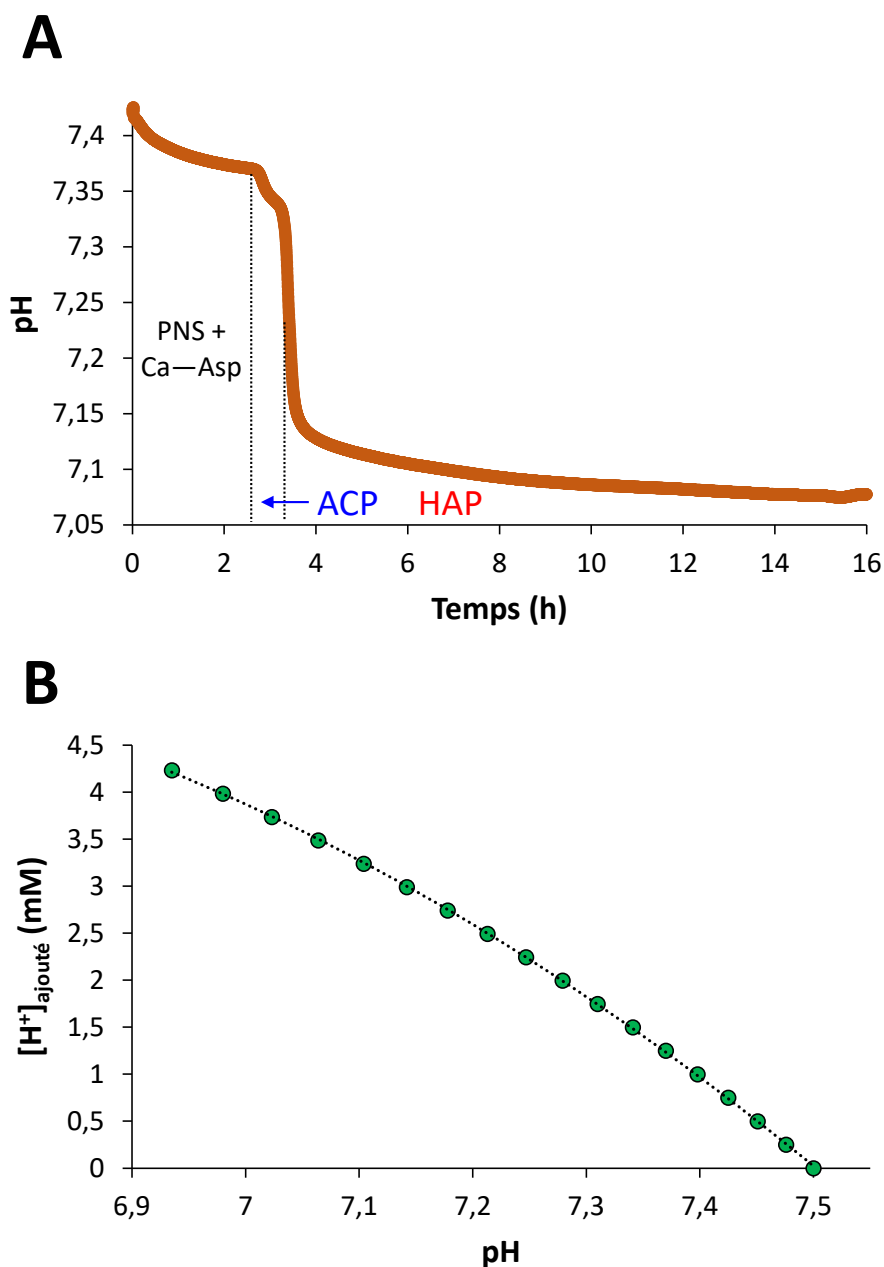


Figure 22 : (A) Suivi potentiométrique du pH de P26 en présence de 0,05 Asp/Ca². (B) Modèle polynomial reliant la quantité d'H⁺ ajouté en solution à la variation du pH.

A partir d'un modèle polynomial ajusté sur un ajout contrôlé d'HCl dans une solution contenant du Tris, des ions phosphates, du pAsp et du KCl dans les mêmes proportions que P26 (Figure 22B), nous avons calculé le profil de relargage protonique au cours de la Figure 23A). Nous observons 2 variations drastiques de cette grandeur après 2 et 5 heures de temps de réaction, correspondant respectivement à la nucléation des nanoparticules et à la cristallisation. Parallèlement, nous avons réalisé un suivi de la quantité de phosphates liés par RMN ³¹P en solution (Figure 23B). Ce dernier présentait pareillement 2 variations soudaines correspondants certainement aux mêmes évènements.

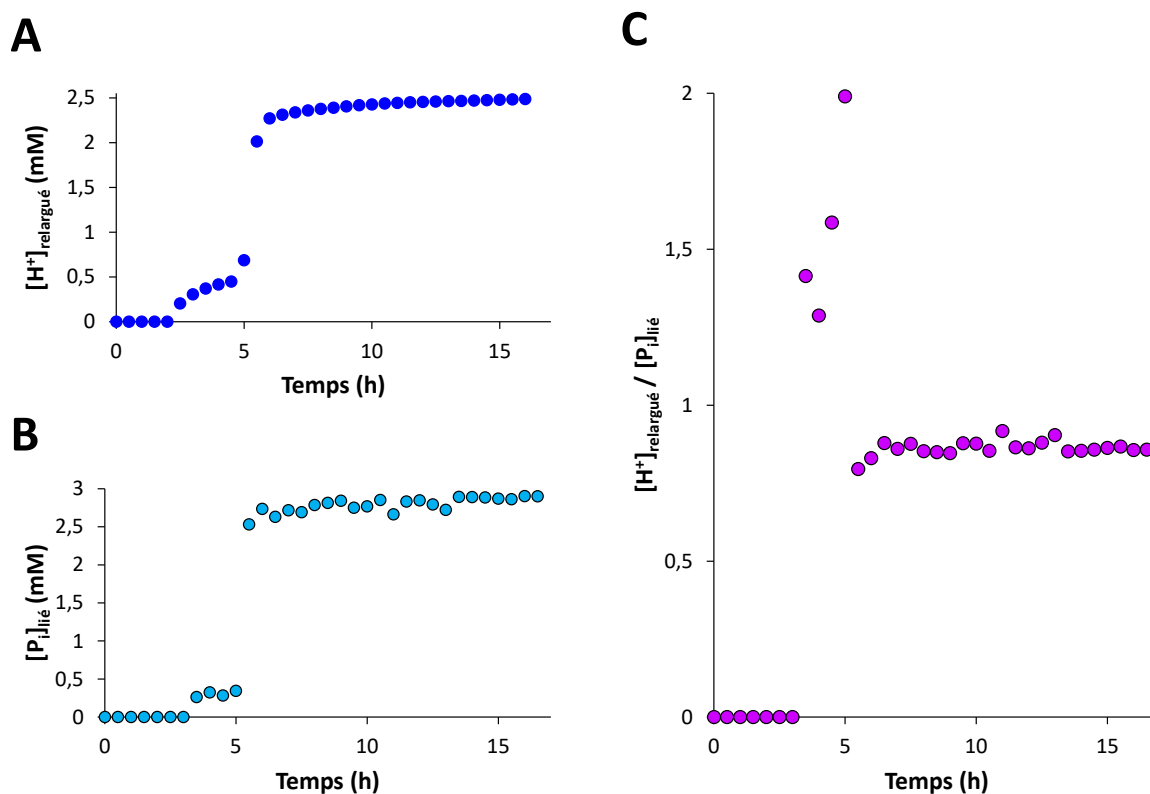


Figure 23: (A) Profil de relargage protonique par potentiométrie pH, (B) suivi de la concentration en ions phosphates liés par RMN ³¹P en solution et (C) variation de la quantité de protons relargué par ion phosphate lié $[H^+]_{\text{relargué}} / [P_i]_{\text{lié}}$ au cours de la précipitation P26 en présence de 0,05 Asp/Ca²⁺. Résolution temporelle = 30 minutes.

De ces 2 courbes, nous avons pu calculer la quantité de protons relargués par ions phosphate lié (Figure 23C) au cours du temps. Nous considérons ici que seuls les phosphates sont capables de se déprotoner, l'acide polyaspartique étant censé conserver le même état de protonation dans cette gamme de pH⁴¹. Entre 2 et 5 heures, le nombre de protons relargués par ions phosphate lié dans les clusters de postnucléation est comprise entre 1 et 2. La valeur obtenue est assez bruitée car la transition de phase est rapide et les réseaux de nanoparticules évoluent rapidement en HAP. Cela implique que les données sont calculées à partir de valeurs de $[H^+]_{\text{relargué}}$ et $[P_i]_{\text{lié}}$ évoluant de manière drastique. Néanmoins, si l'on ne tient pas compte de ces fluctuations importantes et qu'on ne considère que la valeur moyenne de $[H^+]_{\text{relargué}} / [P_i]_{\text{lié}}$, égale à 1,57 dans ce laps de temps, il est possible de calculer l'état de protonation dans les phosphates liés. En effet, l'état de protonation des ions phosphates à pH 7,4 correspondant à une spéciation $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ égale à 0,39 : 0,61. Un relargage de 1,57 proton par les protons liés initialement suivant cette spéciation correspondrait ainsi à des ions PO_4^{3-} . Par extension, nous supposons que les réseaux de nanoparticules issus de la condition de précipitation P30 en présence de 0,25 Asp/Ca²⁺ sont aussi composés uniquement d'ions PO_4^{3-} .

Après la cristallisation en HAP ($t > 5$ heures), nous retrouvons ensuite un rapport $[H^+]_{\text{relargué}} / [P_i]_{\text{lié}}$ légèrement inférieur à 1. Cette valeur signifie que les phosphates s'ajoutant à la structure naissante d'HAP se déprotonent soit d'environ $\frac{1}{2}$ proton par rapport à leur spéciation initiale en solution, soit qu'ils sont majoritairement des HPO_4^{2-} . Ce dernier résultat est similaire aux conclusions trouvées dans le chapitre VI, à savoir que la particule finale présente certainement un cœur cristallin

d'hydroxyapatite ne contenant que des phosphates totalement déprotonés, ainsi qu'une surface pouvant contenir des ions HPO_4^{2-} .

En combinant ces résultats aux rapports Ca/P et Asp/ P_i des espèces liées dans la condition P30, on déduit une formule chimique moyenne de $[\text{Ca}_3\text{PO}_4(\text{Asp})_2]^+_n$ pour les réseaux de nanoparticules. Ces espèces seraient localement chargées positivement. On peut alors imaginer que des anions, par exemple des phosphates ou des chaînes de pAsp puissent venir contrebalancer cette charge et promouvoir des réseaux. Dans ce modèle, nous notifions tout de même quelques artefacts de variations qui ont pour potentielle origine :

- Le faible rapport signal-sur-bruit issu des expériences RMN ^{43}Ca en solution, cela étant dû à la largeur des signaux couplée à la faible sensibilité intrinsèque de ce noyau ;
- Le faible rapport signal-sur-bruit issu des expériences RMN ^1H en solution, cela étant dû à la largeur des signaux couplé aux faibles concentrations en pAsp ;
- Une non concordance des temps de nucléations apparente et effective, ainsi que de cristallisation provenant de l'absence d'agitation mécanique dans le spectromètre.

Le modèle pourrait certainement être plus précis en utilisant des sondes et spectromètres dédiées à la haute sensibilité des noyaux ^{43}Ca et ^1H . Par ailleurs, les différences de cinétique pourraient probablement être réduites en trouvant un moyen d'obtenir des cinétiques davantage reproductibles dans le spectromètre.

Les réseaux de nanoparticules ont ensuite été isolés par centrifugation et étudiés par RMN ^{31}P à l'état solide en conditions humides ($t = 24\text{h}$). Nous avons volontairement introduit de l'eau additionnelle de manière à éviter l'assèchement de la poudre mouillée sous l'effet de la rotation. Le spectre est présenté en Figure 24A et se présente sous la forme d'un signal gaussien large (5,8 ppm de largeur à mi-hauteur) se situant à 3,4 ppm. Sa largeur et son caractère gaussien suggère une distribution de déplacement chimique caractéristique d'un environnement amorphe. A titre de comparaison, la même phase a été isolée par centrifugation, puis lavée plusieurs fois à l'eau avant d'être lyophilisée et analysée par RMN ^{31}P à l'état solide. La poudre obtenue présentait une couleur orangée rappelant celle de l'acide polyaspartique. Le spectre obtenu se trouve en Figure 24B et est assez similaire à son homologue en conditions humides. En particulier, il s'agit d'un signal gaussien large (6,4 ppm de largeur à mi-hauteur) se situant à 2,9 ppm suggérant qu'il s'agit là aussi d'une phase amorphe. De même, le diffractogramme en Figure 24C présente des raies de diffractions très larges représentatives d'une phase amorphe.

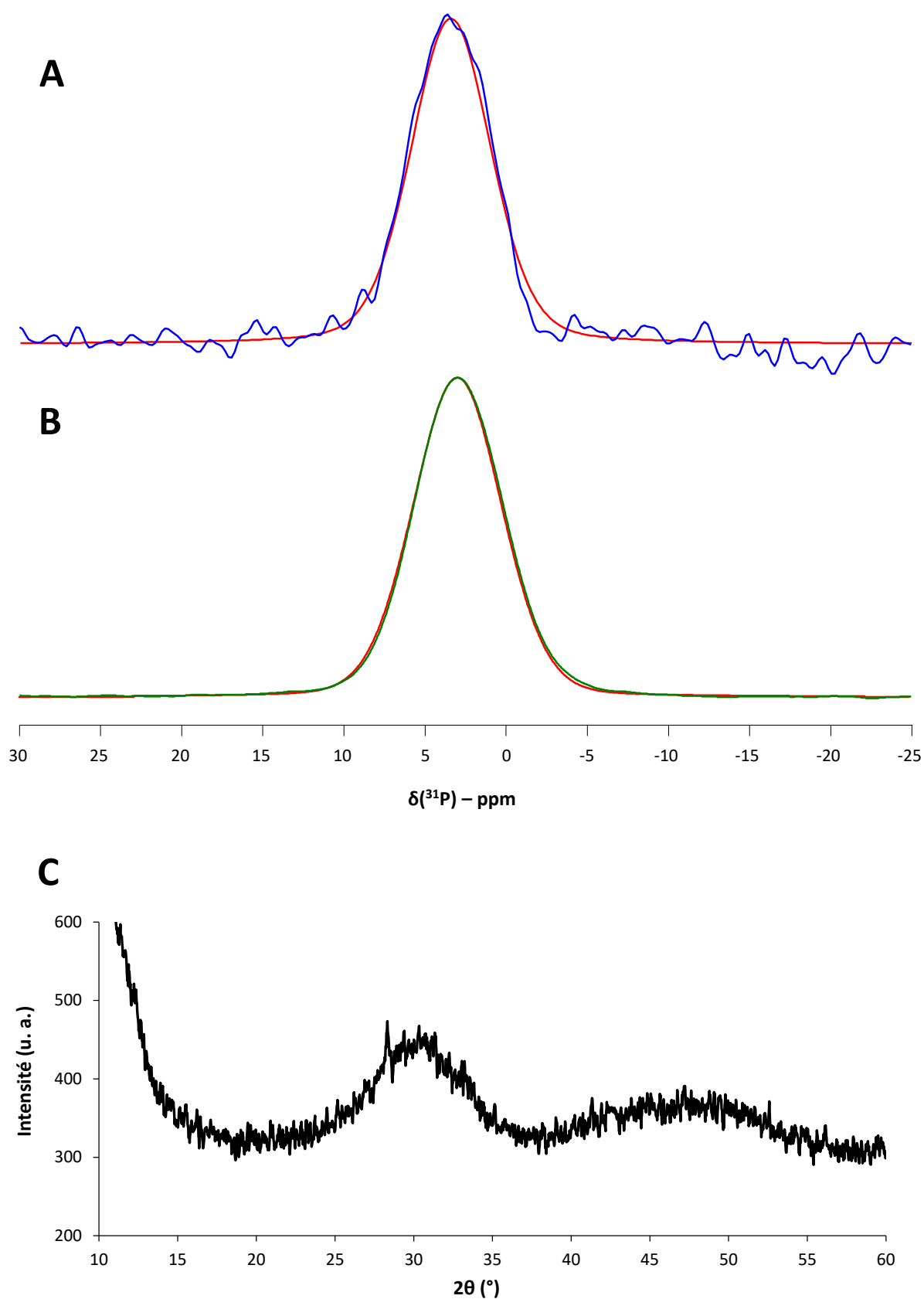


Figure 24 : Spectres ^{31}P CPMAS des réseaux de nanoparticules en conditions (A) humides et (B) sèches. Temps de contact = 2 ms. Rouge = ajustement des spectres expérimentaux. (C) Diffractogramme des réseaux de nanoparticules en conditions sèches.

Par la suite, nous avons caractérisé l'acide polyaspartique supposé précipité avec cette phase. Ajoutons que dans le cadre de cette expérience, l'acide polyaspartique ajouté était un mélange physique des 4 acides polyaspartiques enrichis en ^{13}C à différentes positions dont la représentation est présentée en Figure 25A. Le spectre ^{13}C CPMAS obtenu de l'acide polyaspartique seul est montré en Figure 25B et comporte 4 signaux à 177,4, 177,3, 52,1 et 38,6 ppm. Ces derniers correspondent respectivement aux groupements COO^- , CONH , CH et CH_2 d'après Pivcovà *et al.*⁴².

Par ailleurs, nous avons réalisé une expérience ^1H — ^{13}C LGHetcor dans le but de déterminer la signature spectrale ^1H de l'acide polyaspartique. Nous précisons ici que l'enrichissement en ^{13}C introduit des couplages dipolaires hétéronucléaires ^1H — ^{13}C importants. Cet effet s'ajoute aux couplages dipolaires homonucléaires ^1H présents dans les groupements aliphatiques du polymère, ce qui a pour conséquence d'élargir les signaux ^1H . Ainsi et dans la suite de ce chapitre, nous avons eu recours à l'expérience LGHetcor qui utilise un schéma de découplage de type FSLG permettant d'observer des signaux mieux résolus. En effet, l'utilisation d'une expérience ^1H — ^{13}C Hetcor classique ne permet la détection que d'un immense massif. Ceci étant dit, le spectre ^1H — ^{13}C LGHetcor du mélange d'acide polyaspartique enrichi est présenté en Figure 25C. Précisons que ce polymère est un sel de sodium, c'est-à-dire que les fonctions acides sont déprotonées et donc non détectées dans cette expérience. Pour chaque signal ^{13}C , nous observons 3 corrélations à 2,5, 4,4 et 8,3 ppm. Sur la base de leur déplacement chimique, nous supposons que les deux premières correspondent très certainement aux groupements CH et CH_2 , alors que la troisième proviendrait certainement des groupements amides CONH . Nous remarquons aussi une traînée de déplacement chimique sur la voie proton s'étalant de 9 à 19 ppm. Nous supposons ici que cette dernière fait aussi partie des groupements CONH pouvant former un réseau de liaison H pouvant expliquer cette distribution de déplacements chimiques. Notons que c'est le groupement CH qui présente la corrélation la plus intense avec les protons de la fonction amide. En effet, lors de la préparation de pAsp par polycondensation thermique, la conversion de l'intermédiaire polysuccinimide en pAsp s'opère par une ouverture du cycle imide pouvant se faire de 2 côtés. Le pAsp formé se présente ainsi sous la forme d'un polymère linéaire pouvant contenir des résidus α ($\approx 30\%$) et β ($\approx 70\%$)^{27,41} (Figure 25A). Ainsi, le pAsp obtenu par polymérisation d'un acide aspartique enrichi en ^{13}C sur la position contenant le groupement CH contiendra des résidus CH qui seront toujours à proximité d'une fonction amide.

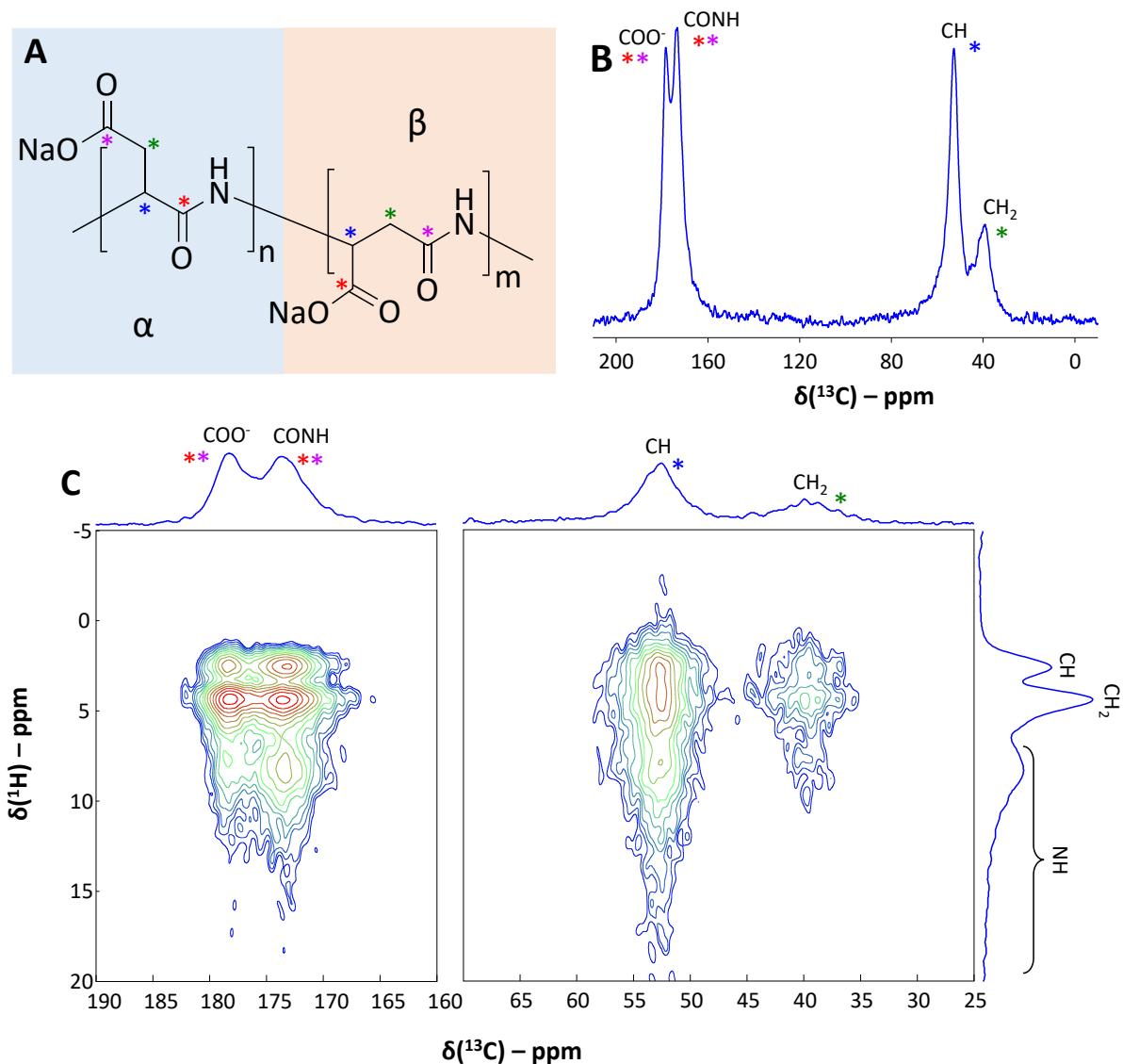


Figure 25 : (A) Représentation schématique des acides polyaspartiques enrichis en ^{13}C . Chaque polyaspartique est enrichi en ^{13}C aux positions marquées d'une étoile de la même couleur. L'hydrolyse du polysuccinimide est réalisée en conditions basiques, on obtient donc un sel de sodium. (B) Spectre ^{13}C CPMAS d'un mélange physique des 4 acides polyaspartiques enrichis en ^{13}C . (C) Spectre 2D ^1H — ^{13}C LGHetcor du mélange physique. Temps de contact = 1 ms.

Si nous nous intéressons maintenant à la signature spectrale ^{13}C CPMAS des réseaux de nanoparticules amorphes (Figure 26) une fois lyophilisée, nous retrouvons les résonances caractéristiques de l'acide polyaspartique. Ces dernières sont légèrement plus larges que lorsqu'étudiées seules, ce qui peut s'expliquer par la lyophilisation ainsi que par la phase amorphe obtenue, amenant du désordre local. Cela confirme bien que l'acide polyaspartique précipite avec la phase minérale lors de la nucléation. Nous précisons ici que la détection d'acide polyaspartique par RMN à l'état solide en utilisant la polarisation croisée est déjà une preuve que celui-ci est en interaction avec la phase minérale. En effet, la polarisation croisée ne permet que la détection des espèces rigides, ce qui au sens de la RMN solide correspond à des espèces solides. La solubilité de pAsp étant très élevée, il aurait été éliminé de la phase précipitée au cours du lavage si ce dernier jouait un rôle purement spectateur.

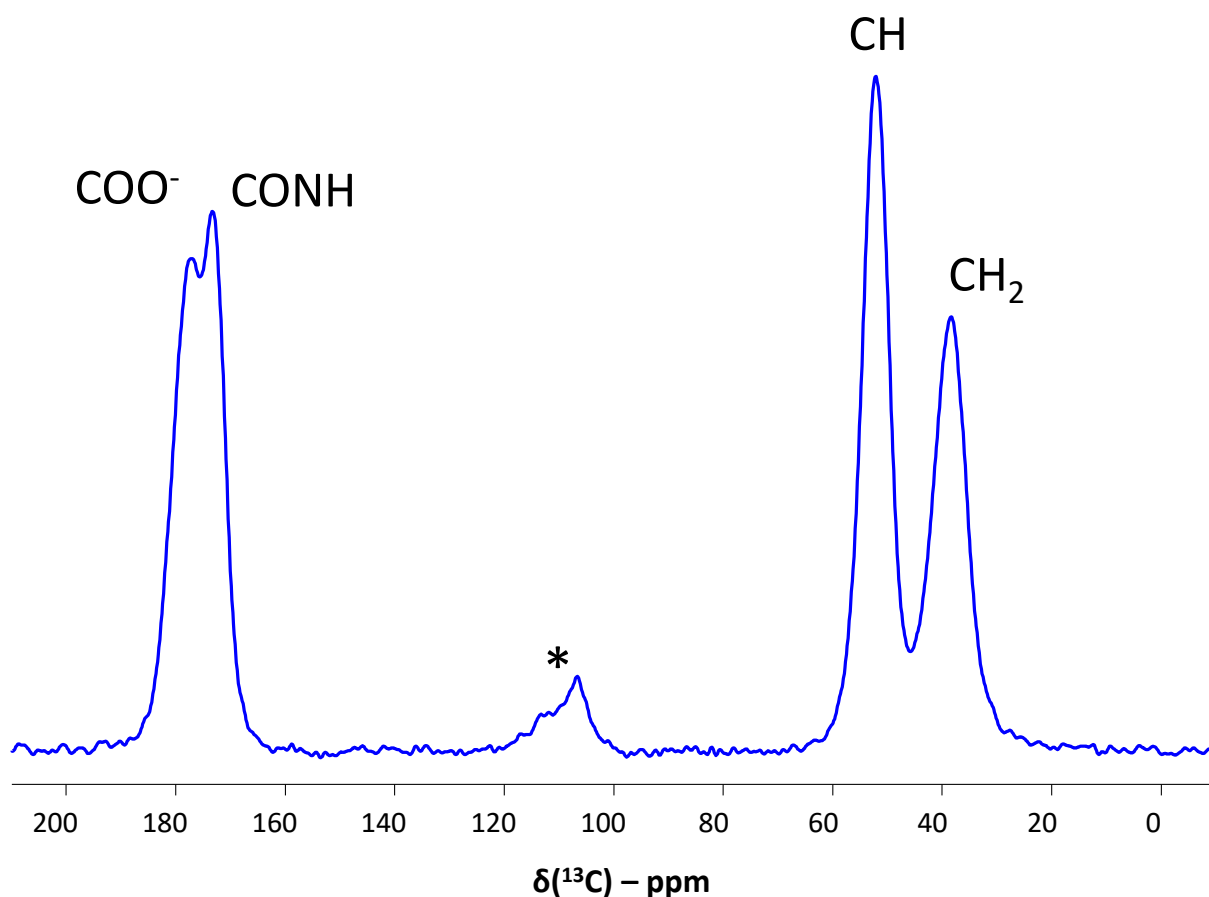


Figure 26 : Spectre ^{13}C CPMAS des réseaux de nanoparticules en conditions sèches. Temps de contact = 1 ms. L'étoile représente une bande de rotation des fonctions carbonyles.

Dans un second temps, nous avons réalisé des expériences de type LGHetcor $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ et $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ dans le but d'obtenir des informations sur les environnements protonés respectifs de la phase organique et de la phase minérale. Les expériences sont respectivement présentées en Figure 27A et Figure 27B. Si nous retrouvons les résonances caractéristiques de pAsp dans la fraction organique, la partie minérale semble légèrement plus complexe. Nous détectons un large massif relativement résolu et contenant trois parties distinctes. En particulier, nous détectons une résonance 2,7 ppm que nous assignons aux protons des groupements CH de pAsp, ainsi qu'un massif maximum à 5 ppm et une traînée s'étendant de 7 ppm à 17 ppm sur la voie proton. Ces deux dernières corrélations semblent manquer de résolution, ce qui peut signifier que plusieurs composantes se superposent ou que les signaux sont larges, témoignant d'un environnement amorphe. Le massif à 5 ppm pourrait ainsi correspondre aux groupements CH_2 de pAsp se superposant à de l'eau structurale. Le massif large s'étendant de 7 à 17 correspond probablement aux CONH impliqués dans des liaisons H, ce qui a été suggéré par une expérience similaire portée sur l'acide polyaspartique pur (Figure 25C). La spéciation des phosphates liés déterminée précédemment pour la condition P26 en présence de $0,05 \text{ Asp}/\text{Ca}^{2+}$ (Figure 23C) suggère que le 2^{ème} massif large ne contient pas de liaisons $\text{P}-\text{OH}$, mais uniquement les groupements amides de l'acide polyaspartique. De manière intéressante, ces expériences suggèrent que la phase minérale présente des corrélations ^1H similaires à la phase organique, signifiant une proximité spatiale de ces 2 environnements se traduisant par des environnements protonés similaires.

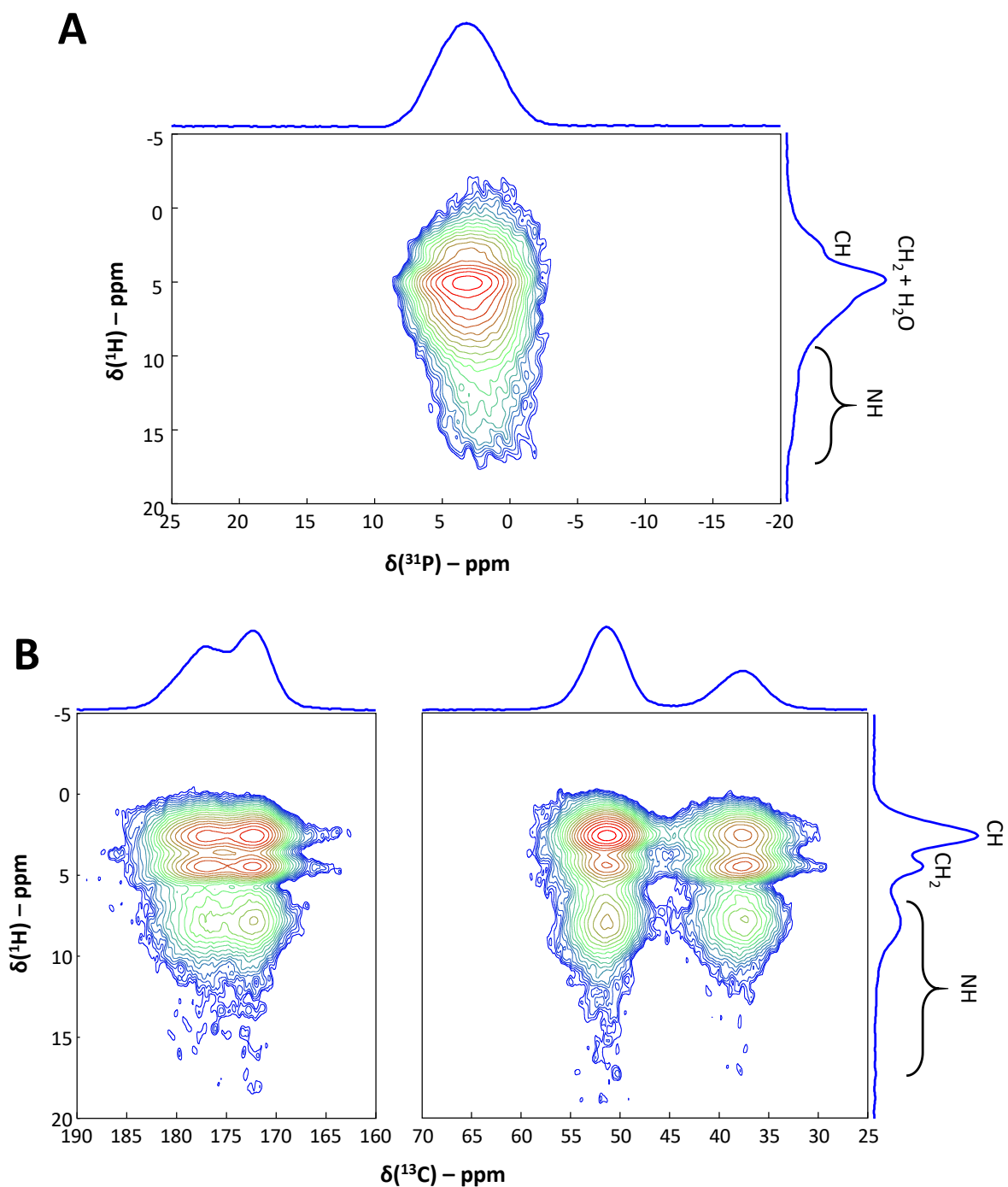


Figure 27 : Spectres 2D (A) ^1H — ^{31}P et (B) ^1H — ^{13}C LGHetcor des réseaux de nanoparticules en conditions sèches. Temps de contact = 1 ms.

Dans l'objectif d'en avoir le cœur net, nous avons réalisé des expériences de ^{13}C CP REDOR $\{^{31}\text{P}\}$. Ce type d'expérience s'appuie sur la comparaison de 2 spectres ^{13}C CPMAS acquis avec et sans irradiation ^{31}P . Cela permet de faire déphaser les signaux qui possèdent un couplage dipolaire hétéronucléaire ^{13}C — ^{31}P , c'est-à-dire les espèces carbonées proches spatialement des espèces phosphatées. Dans notre cas, l'entière déphasage des signaux signifie bien que les phases minérale et organique sont à proximité (Figure 28A). La variation du temps de recouplage permet de déterminer quel signal déphase le plus, ce qui peut nous renseigner sur la fonction de l'acide

polyaspartique la plus proche spatialement de la phase minérale. Comme montré en Figure 28B, il semblerait que la partie la plus proche soient les résidus COO^- . Ce n'est pas très étonnant si on fait le parallèle à la complexation des ions calcium avec les résidus COO^- en solution. Ces résultats semblent ainsi témoigner d'une interaction partant du calcium lié à des phosphates vers des chaînes d'acides polyaspartique $\text{O-PO}_2\text{-O-Ca-COO}^- \text{pAsp}$ où quasiment 100% des fonctions acides interagissent avec la phase minérale. On peut facilement imaginer qu'une même chaîne pourrait ainsi stabiliser plusieurs clusters de phase minérale ce qui donnerait un réseau ramifié de clusters inorganiques relayés par les chaînes de pAsp. Cela expliquerait la morphologie des réseaux observés par cryo-TEM et validerait le modèle de réseaux de nanoparticules proposé dans la littérature.

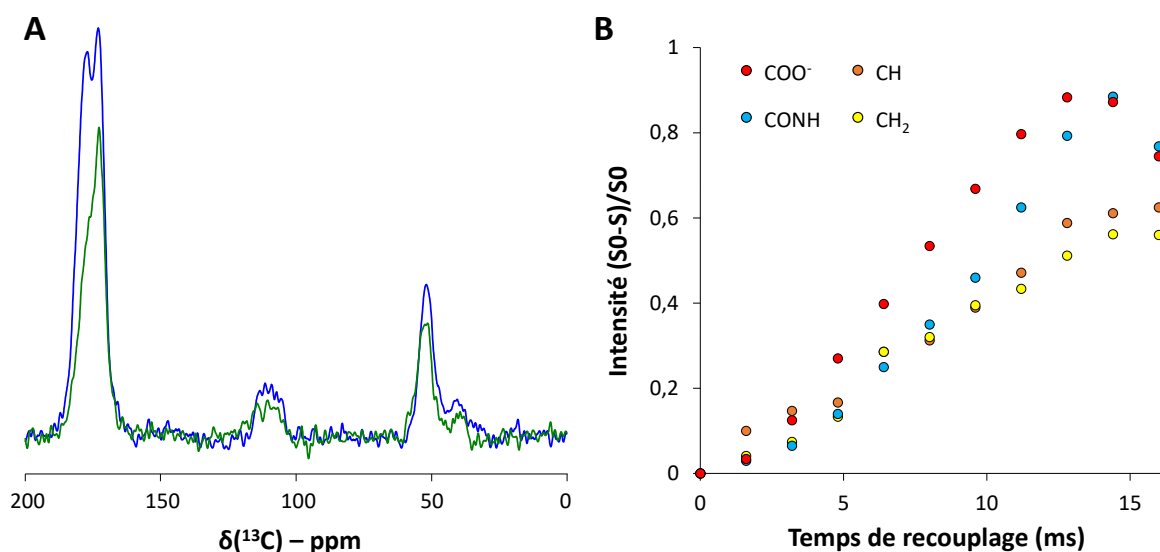


Figure 28 : Spectres ^{13}C CP REDOR $\{^{31}\text{P}\}$ avec et sans irradiation ^{31}P , de la phase PILP. Les spectres avec et sans irradiation sont respectivement en vert et en bleu. Temps d'irradiation = 8 ms. (B) Profil de déphasage de la composante amorphe en fonction du temps de recouplage. Temps de contact = 1 ms.

3) L'hydroxyapatite biomimétique

Les résultats issus de l'analyse dynamique dans la partie précédente suggèrent qu'une partie de l'acide polyaspartique est relarguée dans le milieu au moment de la cristallisation de l'Hap et n'est donc pas en interaction avec la phase finale obtenue. Ainsi, les deux objectifs de ces derniers paragraphes sont de vérifier que la phase finale obtenue à partir des réseaux de nanoparticules est bien de l'hydroxyapatite « biomimétique » et de vérifier si cette dernière est en interaction avec pAsp. Le solide final obtenu après 72 heures de mélange dans la condition de précipitation P30 en présence de $0,25 \text{ Asp}/\text{Ca}^{2+}$ a été centrifugé, lavé et lyophilisé. Le solide a ensuite été inséré dans un rotor de 4 mm pour être caractérisé par RMN à l'état solide.

Le spectre ^{31}P par excitation directe est présenté en Figure 29A. Il s'agit d'un spectre contenant clairement au moins 2 composantes, car il n'est pas symétrique. Il est relativement large (3,3 ppm de largeur à mi-hauteur) ce qui suggère une faible cristallinité et/ou la présence d'une composante amorphe en accord avec les conditions de synthèse. Le spectre 2D $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ Hetcor (Figure 29B) permet effectivement de distinguer 2 composantes. La première composante est centrée à 2,9 ppm dans la

voie ^{31}P et corrèle avec un déplacement chimique se situant à 0 ppm dans la voie ^1H . Ces deux déplacements chimiques sont typiques d'une hydroxyapatite et correspondent respectivement aux ions PO_4^{3-} et OH^- . La 2^{ème} composante est centrée à 2,1 ppm dans la voie ^{31}P , est relativement large (4,7 ppm de largeur à mi-hauteur), et semble corrélérer avec un large massif s'étendant de 1,5 ppm à 18 ppm dans la voie ^1H avec un maximum à 5,7 ppm. Si la résonance des résidus CH de pAsp est identifiable à 2,8 ppm, le reste du massif est peu résolu et pourrait contenir les autres résidus de pAsp, de l'eau structurale, ainsi que des liaisons P—OH provenant d'ions HPO_4^{2-} , comme suggéré par le rapport $[\text{H}^+]_{\text{relargué}} / [\text{P}]_{\text{lié inférieur à 1}}$ déterminé précédemment pour la condition P26 en présence de 0,05 Asp/ Ca^{2+} (Figure 23C). De ces expériences, nous pouvons d'ores et déjà conclure sur la nature apatitique de la phase minérale finale dans nos conditions de précipitation. La composante amorphe rappelle la couche amorphe de surface présente dans les hydroxyapatites biomimétiques⁴³.

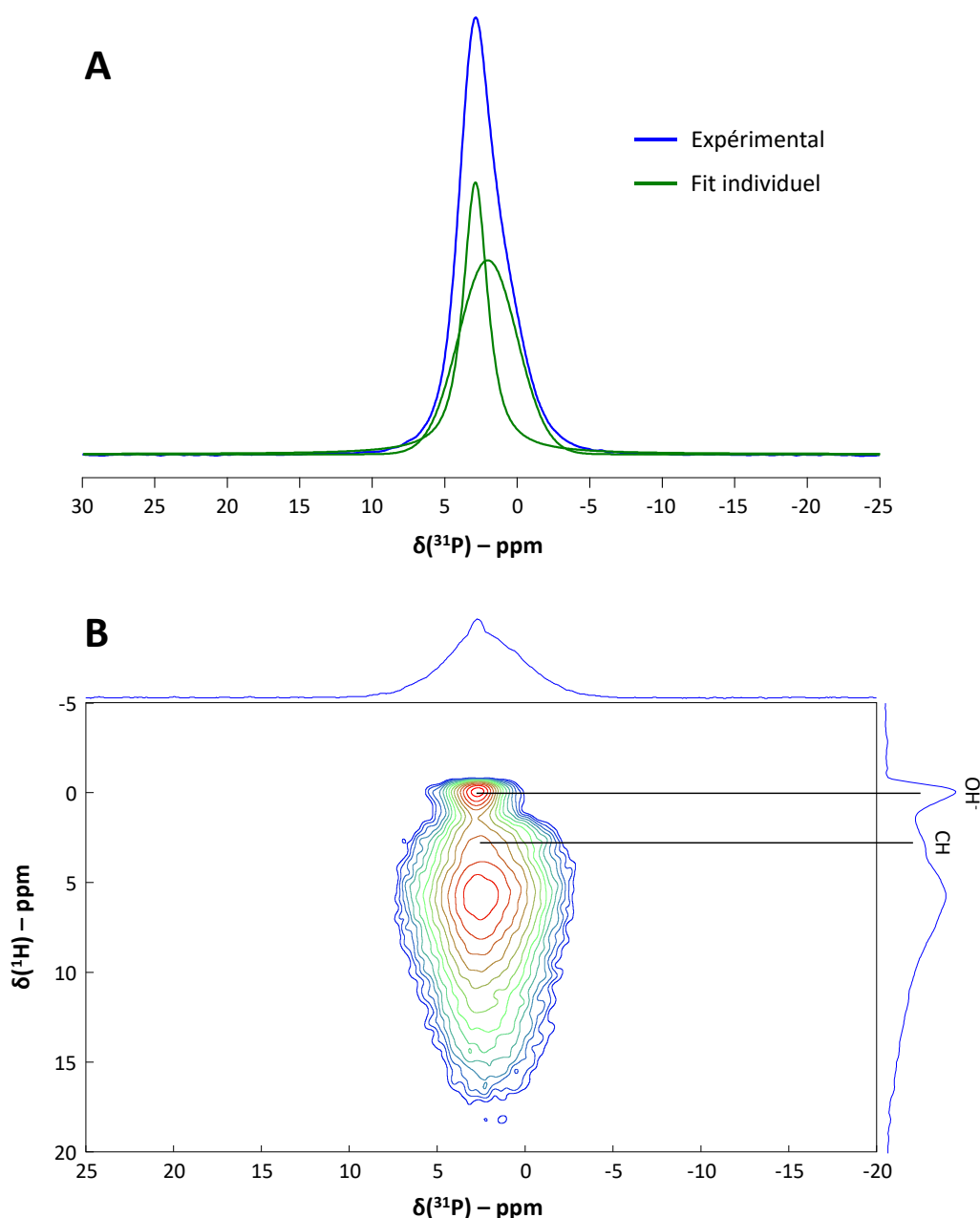


Figure 29 : Spectre ^{31}P par excitation directe (B) et spectre 2D $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ LGHetcor de l'hydroxyapatite biomimétique obtenu en présence d'acide polyaspartique. Temps de contact = 1 ms.

Dans l'objectif d'étudier la proximité de ces 2 environnements phosphatés, nous avons réalisé une expérience de type CP ^1H — ^{31}P aller-et-retour suivi par un échange d'aimantation relayé par la diffusion de spins des protons. Cette approche a été utilisée par le passé par Von Euw *et al.* pour démontrer que les protons de la phase apatitique et de la phase amorphe étaient proches spatialement dans le minéral osseux⁴³. Dans notre cas, l'expérience est présentée en Figure 30B. Dans celle-ci, nous observons que les protons apatitiques à 0 ppm présentent des corrélations à longue distance avec les protons de la phase amorphe entre 3 et 15 ppm qui n'ont pas été observées à faible temps de mélange (Figure 30A)⁴³. Cela démontre ainsi que nous sommes en présence d'une hydroxyapatite recouverte d'une surface amorphe et pas en présence de deux phases indépendantes.

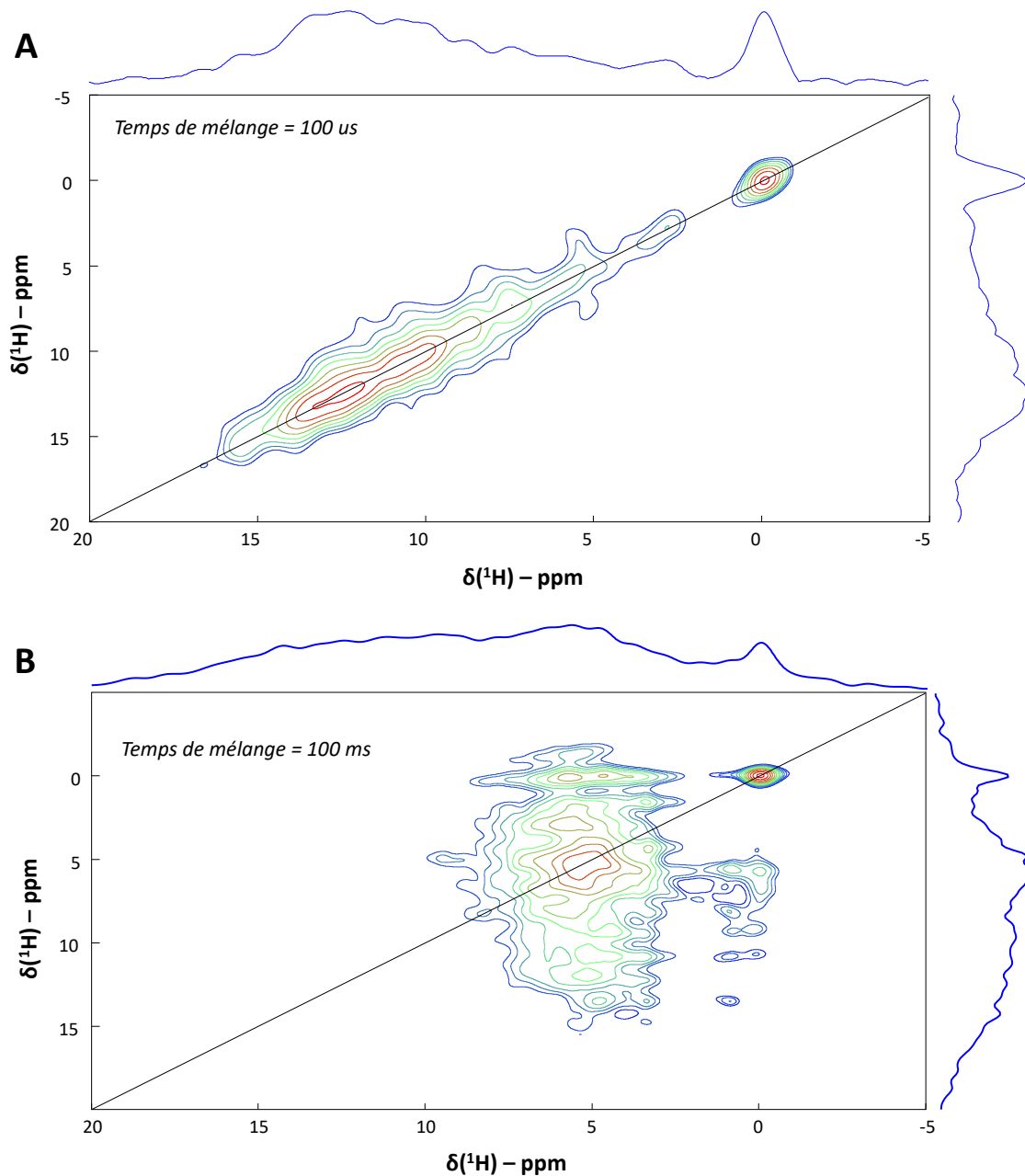


Figure 30 : Spectre 2D ^1H — ^1H Double CP-SPINDIFF de l'hydroxyapatite biomimétique obtenu en présence d'acide polyaspartique. Temps de contact aller et retour = 1 ms. (A) Temps de mélange = 100 μs , (B) Temps de mélange = 100 ms.

Nous nous sommes ensuite tournés vers la partie organique des particules obtenues. Le spectre ^{13}C obtenu par excitation directe est présenté en Figure 31A. Nous retrouvons une nouvelle fois les 4 signaux caractéristiques des 4 groupements caractéristiques de l'acide polyaspartique, démontrant qu'il reste du pAsp même après le lavage, ce qui est en accord avec l'expérience de RMN ^1H en solution ci-dessus (Figure 20B). L'expérience ^1H – ^{13}C Hetcor a été réalisée dans le but d'identifier ou non la proximité des ions OH^- apatitiques avec l'acide polyaspartique (Figure 31B). En l'effet, nous n'observons pas de corrélation entre l'acide polyaspartique et les ions OH^- apatitiques, ce qui semble indiquer que l'acide polyaspartique ne se situe pas dans le cœur cristallin de la phase minérale. Nous en déduisons que l'additif organique pourrait se situer sur la couche amorphe de surface.

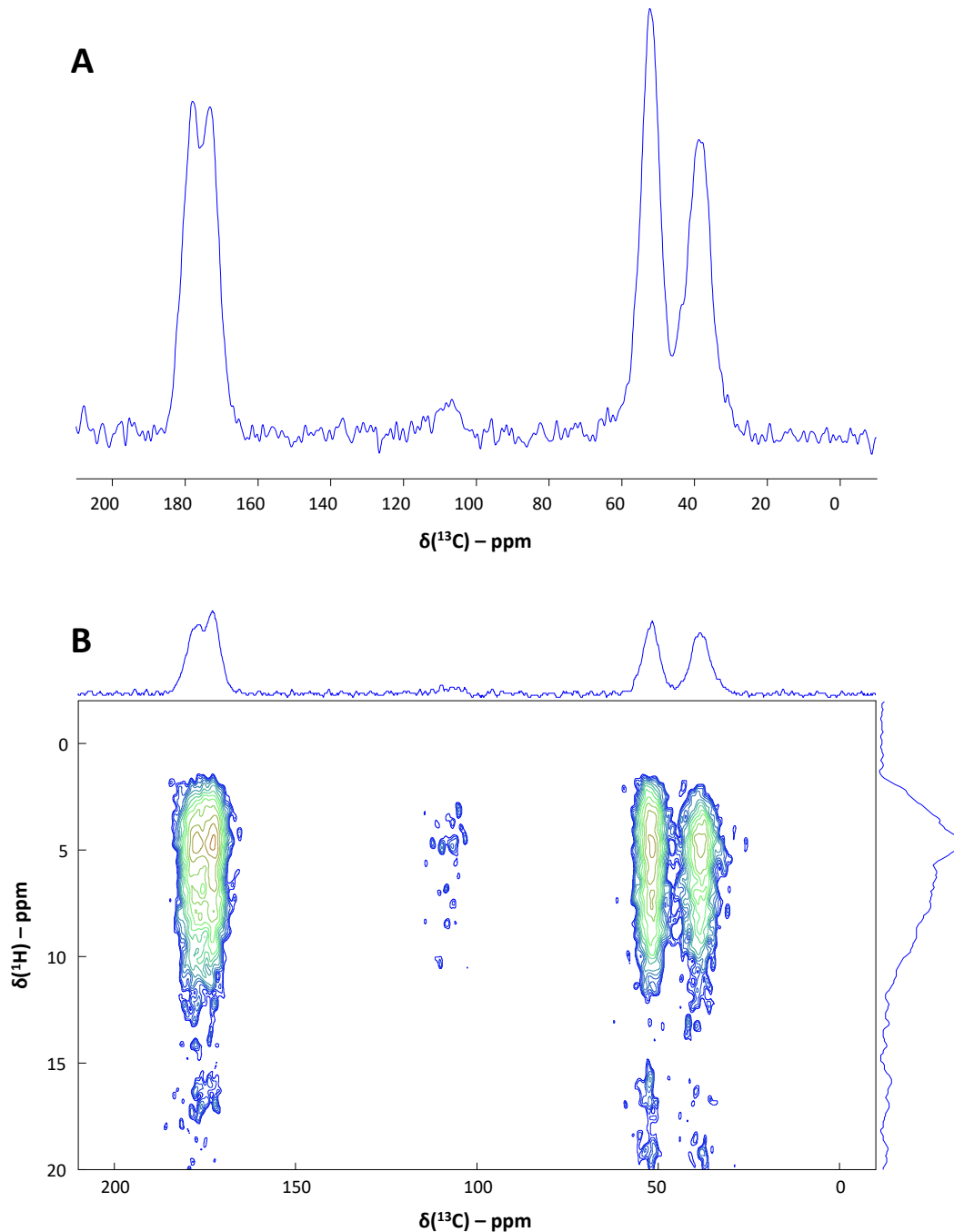


Figure 31 : (A) Spectre ^{13}C par excitation directe (B) et spectre 2D ^1H – ^{13}C LGHetcor de l'hydroxyapatite biomimétique obtenu en présence d'acide polyaspartique. Temps de contact = 1 ms.

Dans le but d'en avoir le cœur net, nous avons réalisé une expérience de type ^{31}P CP REDOR $\{^{13}\text{C}\}$. Cette fois-ci, l'acquisition a été réalisée sur la voie ^{31}P avec ou sans irradiation ^{13}C pour étudier la sélectivité de l'interaction organo-minérale sur la phase minérale. A titre d'exemple, les spectres avec et sans irradiation ^{13}C sont présentés en Figure 32A pour un temps d'irradiation de 8 ms. La différence des 2 spectres permet de mettre en évidence la partie du signal à proximité spatiale de l'acide polyaspartique, qui se trouve être la composante amorphe (Figure 32C). Cette expérience prouve ainsi que l'acide polyaspartique n'interagit qu'avec la surface amorphe de l'hydroxyapatite biomimétique obtenue dans nos conditions. Le profil de déphasage est présenté en Figure 32B. Nous remarquons que l'intensité de la différence des signaux sans et avec irradiation ^{13}C augmente à mesure que le temps d'irradiation augmente. D'une telle courbe, on peut généralement déterminer une distance atomique entre les espèces carbonées et phosphatées. Néanmoins, il ne s'agit ici pas d'une paire de spins, qui compose le modèle le plus simple. Le caractère amorphe de cette phase et la dynamique des chaînes polymères pourraient compliquer l'interprétation. Ainsi, il était prévu de déterminer la distance atomique en élaborant des modèles de simulation, mais cela n'a pas pu être réalisé, par manque de temps.

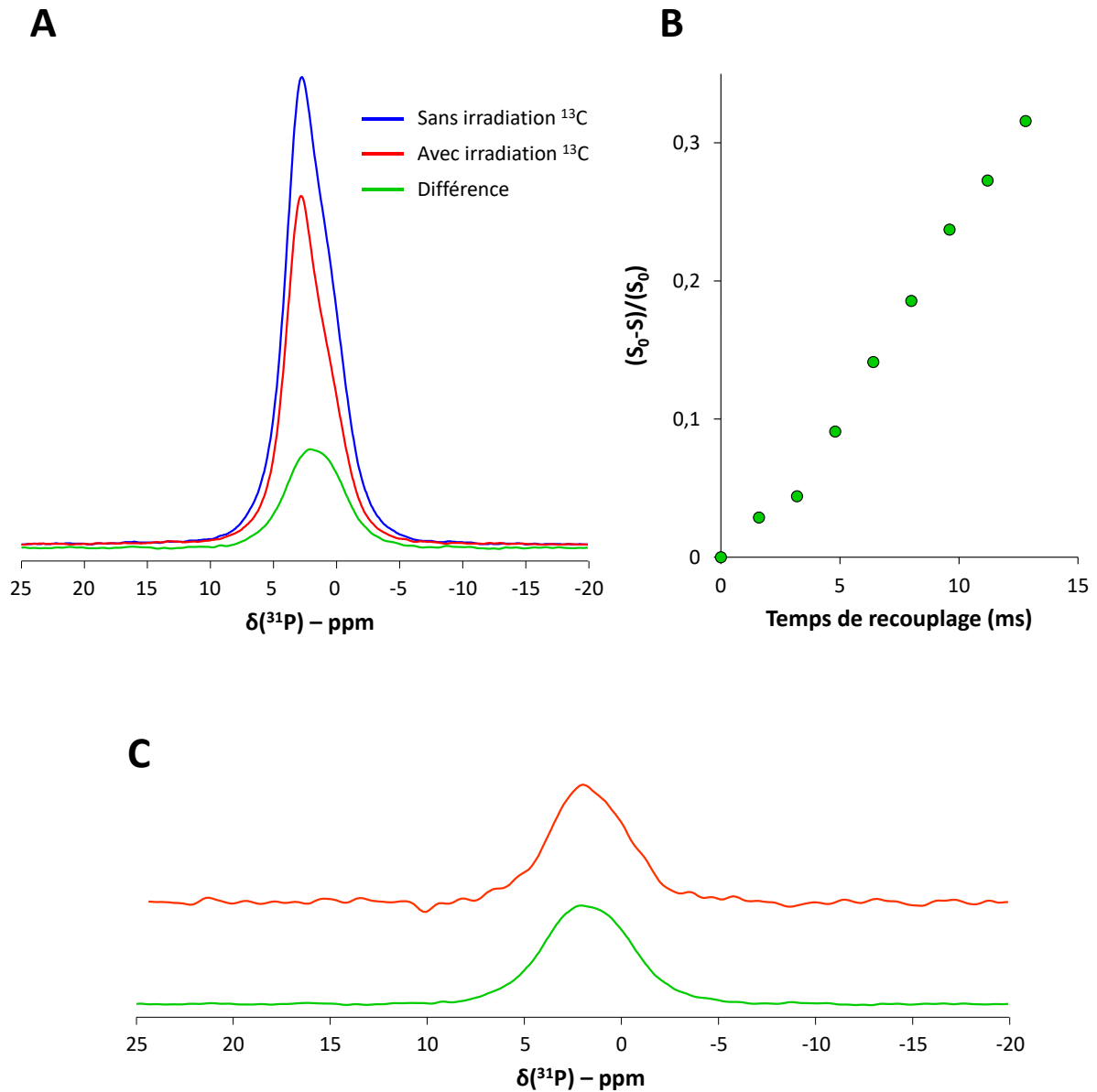


Figure 32 : (A) Spectres ^{31}P CP REDOR $\{^{13}\text{C}\}$ avec et sans irradiation ^{13}C , de l'hydroxyapatite biomimétique obtenue en présence d'acide polyaspartique. Les spectres avec et sans irradiation sont respectivement en rouge et en bleu. La différence des spectres est représentée en vert. Temps d'irradiation = 8 ms. (B) Profil de déphasage de la composante amorphe en fonction du temps de recouplage. Temps de contact = 1 ms. (C) Comparaison des spectres ^{31}P CP de la couche amorphe de surface (haut, orange) issu de l'extraction de la tranche $\delta(^1\text{H}) = 5$ ppm de l'expérience LGHetcor et de la différence des spectres REDOR (bas, vert).

VI. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu étudier l'influence de l'acide polyaspartique, connu pour mimer l'action des protéines non-collagéniques, dans le cadre de la nucléation non classique de l'hydroxyapatite. Nous avons tout d'abord pu être témoin de son action inhibitrice sur la cinétique de précipitation qui dépendrait de la proportion relative de résidus Asp/Ca²⁺. Nos observations par cryo-TEM suggèrent que l'acide polyaspartique stabilise une phase s'arrangeant en réseau de nanoparticules. Pour cela, l'acide polyaspartique s'adsorberait sur les clusters solides apparaissant après la nucléation et limiterait leur agrégation en sphères de tailles réduites.

Nos expériences par RMN ⁴³Ca en solution semblent indiquer que les ions Ca²⁺ peuvent être complexés par 6 résidus acides, mais que certains d'entre eux sont remplacés par des ions phosphates, donnant lieu à des ultrastructures rigides d'espèces de prénucléation. Si la composition de ces derniers n'a pas pu être déterminées, nous avons démontré expérimentalement l'interaction des ions inorganiques avec le polymère soluble par MAS-DNP sur solutions vitrifiées. La nucléation semble ensuite se produire de manière progressive et non pas de manière coordonnée comme observé en conditions purement inorganiques. Des expériences de RMN en solution *in situ* ont permis de déterminer la composition des réseaux de nanoparticules dans nos conditions. Cette dernière serait composée de clusters solides amorphes de [Ca₃PO₄(Asp)₂]⁺ dans lesquels les résidus acides proviendraient de 2 chaînes différentes d'acide polyaspartique. Le caractère amorphe de cette phase pourrait provenir de la grande diversité des chaînes d'acide polyaspartique et des sites de complexation différents au sein de ces mêmes chaînes. Ces dernières pourraient ainsi interagir avec différents clusters solides (Figure 33) ce qui pourrait expliquer les tailles micrométriques des réseaux observés par cryo-TEM.

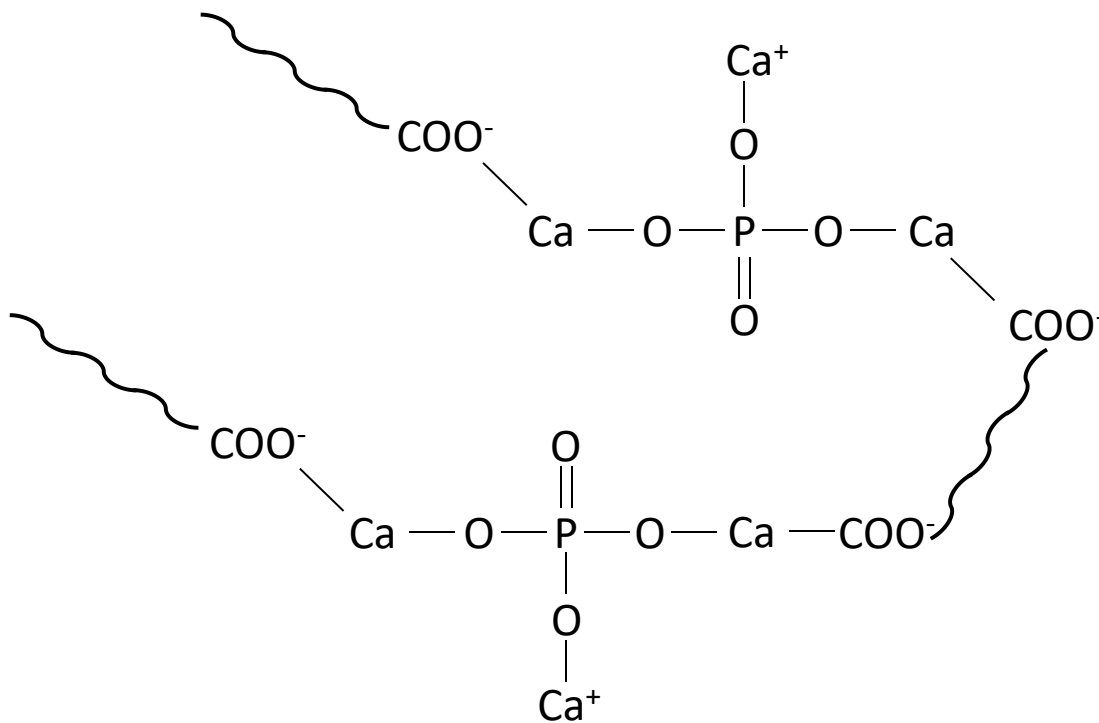


Figure 33 : Représentation schématique des réseaux de nanoparticules relayés par les chaînes de pAsp.

Nous avons ensuite noté l'orientation de ces clusters conduisant à la formation de nano-bâtonnets d'hydroxyapatite. Cela suggère que les nanoparticules amorphes arrangées en réseau se transforment directement en hydroxyapatite sans passer par d'autres phases minérales intermédiaires. Cette transformation semble exclure la présence d'acide polyaspartique dans la phase naissante d'hydroxyapatite. Toutefois, l'hydroxyapatite obtenue serait recouverte d'une couche de surface amorphe dans laquelle les chaînes d'acide polyaspartique seraient encore en interaction. L'analyse de l'état de protonation des phosphates dans cette phase permet d'indiquer que cette couche de surface amorphe est différente des réseaux de nanoparticules et qu'elle contient notamment des ions HPO_4^{2-} , comme observé en conditions purement inorganiques ou dans le minéral osseux.

De manière générale, nos résultats suggèrent que l'acide polyaspartique est en interaction avec toutes les phases transitoires précédant la formation d'hydroxyapatite, mais pas directement avec cette dernière. Une représentation schématique du mécanisme complet est présentée en Figure 34.

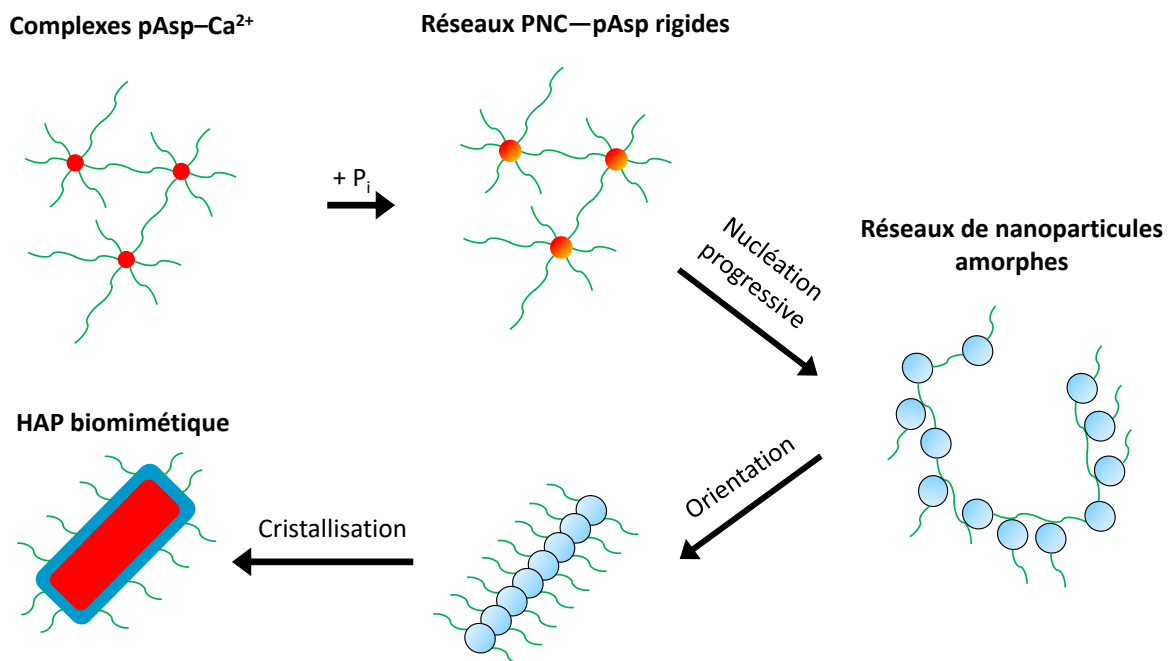


Figure 34 : Représentation schématique du mécanisme de formation d'HAP en présence de pAsp. Le nombre de résidus Asp autour des PNC et de la couche amorphe de surface d'HAP n'est pas connu et est représenté ici à titre indicatif.

Références bibliographiques

- (1) Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008, 3 (Supplement 3), S131–S139. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>.
- (2) Delmas, P. D.; Tracy, R. P.; Riggs, B. L.; Mann, K. G. Identification of the Noncollagenous Proteins of Bovine Bone by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Calcif. Tissue Int.* 1984, 36 (1), 308–316. <https://doi.org/10.1007/BF02405335>.
- (3) Boskey, A. L. Noncollagenous Matrix Proteins and Their Role in Mineralization. *Bone Miner.* 1989, 6 (2), 111–123. [https://doi.org/10.1016/0169-6009\(89\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0169-6009(89)90044-5).
- (4) George, A.; Veis, A. Phosphorylated Proteins and Control over Apatite Nucleation, Crystal Growth, and Inhibition. *Chem. Rev.* 2008, 108 (11), 4670–4693. <https://doi.org/10.1021/cr0782729>.
- (5) Gorski, J. P. Acidic Phosphoproteins from Bone Matrix: A Structural Rationalization of Their Role in Biomineralization. *Calcif. Tissue Int.* 1992, 50 (5), 391–396. <https://doi.org/10.1007/BF00296767>.
- (6) Lee, S. L.; Veis, A. Cooperativity in Calcium Ion Binding to Repetitive, Carboxylate-Serylphosphate Polypeptides and the Relationship of This Property to Dentin Mineralization. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1980, 16 (3), 231–240. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1980.tb02957.x>.
- (7) Qi, Y.; Ye, Z.; Fok, A.; Holmes, B. N.; Espanol, M.; Ginebra, M.-P.; Aparicio, C. Effects of Molecular Weight and Concentration of Poly(Acrylic Acid) on Biomimetic Mineralization of Collagen. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2018, 4 (8), 2758–2766. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00512>.
- (8) Thula, T. T.; Svedlund, F.; Rodriguez, D. E.; Podschun, J.; Pendi, L.; Gower, L. B. Mimicking the Nanostructure of Bone: Comparison of Polymeric Process-Directing Agents. *Polymers* 2011, 3 (1), 10–35. <https://doi.org/10.3390/polym3010010>.
- (9) Deshpande, A. S.; Beniash, E. Bioinspired Synthesis of Mineralized Collagen Fibrils. *Cryst. Growth Des.* 2008, 8 (8), 3084–3090. <https://doi.org/10.1021/cg800252f>.
- (10) Olszta, M. J.; Cheng, X.; Jee, S. S.; Kumar, R.; Kim, Y.-Y.; Kaufman, M. J.; Douglas, E. P.; Gower, L. B. Bone Structure and Formation: A New Perspective. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* 2007, 58 (3), 77–116. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>.
- (11) Nudelman, F.; Pieterse, K.; George, A.; Bomans, P. H. H.; Friedrich, H.; Brylka, L. J.; Hilbers, P. A. J.; de With, G.; Sommerdijk, N. A. J. M. The Role of Collagen in Bone Apatite Formation in the Presence of Hydroxyapatite Nucleation Inhibitors. *Nat. Mater.* 2010, 9 (12), 1004–1009. <https://doi.org/10.1038/nmat2875>.
- (12) Burke, E. M.; Guo, Y.; Colon, L.; Rahima, M.; Veis, A.; Nancollas, G. H. Influence of Polyaspartic Acid and Phosphoryn on Octacalcium Phosphate Growth Kinetics. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2000, 17 (1), 49–57. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00084-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00084-3).
- (13) Peytcheva, A.; Cölfen, H.; Schnablegger, H.; Antonietti, M. Calcium Phosphate Colloids with Hierarchical Structure Controlled by Polyaspartates. *Colloid Polym. Sci.* 2002, 280 (3), 218–227. <https://doi.org/10.1007/s00396-001-0600-0>.
- (14) Ye, J.; Wang, D.; Zeiger, D. N.; Miles, W. C.; Lin-Gibson, S. Different Kinetic Pathways of Early Stage Calcium-Phosphate Cluster Aggregation Induced by Carboxylate-Containing Polymers. *Biomacromolecules* 2013, 14 (10), 3417–3422. <https://doi.org/10.1021/bm400660a>.

- (15) Krogstad, D. V.; Wang, D.; Lin-Gibson, S. Polyaspartic Acid Concentration Controls the Rate of Calcium Phosphate Nanorod Formation in High Concentration Systems. *Biomacromolecules* 2017, 18 (10), 3106–3113. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00772>.
- (16) Krogstad, D. V.; Wang, D.; Lin-Gibson, S. Kinetics of Aggregation and Crystallization of Polyaspartic Acid Stabilized Calcium Phosphate Particles at High Concentrations. *Biomacromolecules* 2015, 16 (5), 1550–1555. <https://doi.org/10.1021/bm501725t>.
- (17) Quan, B. D.; Sone, E. D. The Effect of Polyaspartate Chain Length on Mediating Biomimetic Remineralization of Collagenous Tissues. *J. R. Soc. Interface* 2018, 15 (147), 20180269. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0269>.
- (18) Rieger, J.; Frechen, T.; Cox, G.; Heckmann, W.; Schmidt, C.; Thieme, J. Precursor Structures in the Crystallization/Precipitation Processes of CaCO₃ and Control of Particle Formation by Polyelectrolytes. *Faraday Discuss.* 2007, 136 (0), 265–277. <https://doi.org/10.1039/B701450C>.
- (19) Rodriguez, D. E.; Thula-Mata, T.; Toro, E. J.; Yeh, Y.-W.; Holt, C.; Holliday, L. S.; Gower, L. B. Multifunctional Role of Osteopontin in Directing Intrafibrillar Mineralization of Collagen and Activation of Osteoclasts. *Acta Biomater.* 2014, 10 (1), 10.1016/j.actbio.2013.10.010. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.010>.
- (20) Saxena, N.; Mizels, J.; Cremer, M. A.; Guarnizo, V.; Rodriguez, D. E.; Gower, L. B. Comparison of Synthetic vs. Biogenic Polymeric Process-Directing Agents for Intrafibrillar Mineralization of Collagen. *Polymers* 2022, 14 (4), 775. <https://doi.org/10.3390/polym14040775>.
- (21) Zhao, W.; Wang, Z.; Xu, Z.; Sahai, N. Osteocalcin Facilitates Calcium Phosphate Ion Complex Growth as Revealed by Free Energy Calculation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018, 20 (18), 13047–13056. <https://doi.org/10.1039/C8CP01105B>.
- (22) Zhang, Z.; Gao, D.; Zhao, H.; Xie, C.; Guan, G.; Wang, D.; Yu, S.-H. Biomimetic Assembly of Polypeptide-Stabilized CaCO₃ Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 2006, 110 (17), 8613–8618. <https://doi.org/10.1021/jp060838u>.
- (23) Kim, Y.-Y.; Douglas, E. P.; Gower, L. B. Patterning Inorganic (CaCO₃) Thin Films via a Polymer-Induced Liquid-Precursor Process. *Langmuir* 2007, 23 (9), 4862–4870. <https://doi.org/10.1021/la061975l>.
- (24) Gower, L. B.; Odom, D. J. Deposition of Calcium Carbonate Films by a Polymer-Induced Liquid-Precursor (PILP) Process. *J. Cryst. Growth* 2000, 210 (4), 719–734. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(99\)00749-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(99)00749-6).
- (25) Homeijer, S. J.; Barrett, R. A.; Gower, L. B. Polymer-Induced Liquid-Precursor (PILP) Process in the Non-Calcium Based Systems of Barium and Strontium Carbonate. *Cryst. Growth Des.* 2010, 10 (3), 1040–1052. <https://doi.org/10.1021/cg800918g>.
- (26) Wohlrab, S.; Cölfen, H.; Antonietti, M. Crystalline, Porous Microspheres Made from Amino Acids by Using Polymer-Induced Liquid Precursor Phases. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44 (26), 4087–4092. <https://doi.org/10.1002/anie.200462467>.
- (27) Nakato, T.; Yoshitake, M.; Matsubara, K.; Tomida, M.; Kakuchi, T. Relationships between Structure and Properties of Poly(Aspartic Acid)s. *Macromolecules* 1998, 31 (7), 2107–2113. <https://doi.org/10.1021/ma971629y>.
- (28) Adelnia, H.; Blakey, I.; Little, P. J.; Ta, H. T. Hydrogels Based on Poly(Aspartic Acid): Synthesis and Applications. *Front. Chem.* 2019, 7.
- (29) van Rossum, B.-J.; Förster, H.; de Groot, H. J. M. High-Field and High-Speed CP-MAS ¹³C NMR Heteronuclear Dipolar-Correlation Spectroscopy of Solids with Frequency-Switched Lee-

- Goldburg Homonuclear Decoupling. *J. Magn. Reson.* 1997, 124, 516–519. <https://doi.org/10.1006/jmre.1996.1089>.
- (30) Li, Y.; Evans, J. N. S. The Importance of XY-8 Phase Cycling in the Rotational-Echo Double-Resonance Experiment with Total Sideband Suppression. *J. Magn. Reson. A* 1995, 116 (2), 150–155. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.0003>.
- (31) Ramnarain, V.; Georges, T.; Ortiz Peña, N.; Ihiawakrim, D.; Longuinho, M.; Bulou, H.; Gervais, C.; Sanchez, C.; Azaïs, T.; Ersen, O. Monitoring of CaCO₃ Nanoscale Structuration through Real-Time Liquid Phase Transmission Electron Microscopy and Hyperpolarized NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 2022, 144 (33), 15236–15251. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c05731>.
- (32) Andersson, T.; Drakenberg, T.; Forsen, S.; Thulin, E.; Swaerd, M. Direct Observation of the Calcium-43 NMR Signals from Calcium(2+) Bound to Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104 (2), 576–580. <https://doi.org/10.1021/ja00366a035>.
- (33) Parello, J.; Lilja, H.; Cave, A.; Lindman, B. A ⁴³Ca NMR Study of the Binding of Calcium to Parvalbumins. *FEBS Lett.* 1978, 87 (2), 191–195. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80329-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80329-9).
- (34) Becker, W.; Bhattiprolu, K. C.; Gubensäk, N.; Zangger, K. Investigating Protein–Ligand Interactions by Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemphyschem* 2018, 19 (8), 895–906. <https://doi.org/10.1002/cphc.201701253>.
- (35) Bryce, D. L. Calcium Binding Environments Probed by (⁴³)Ca NMR Spectroscopy. *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003 2010, 39 (37), 8593–8602. <https://doi.org/10.1039/c0dt00416b>.
- (36) Grutzner, J. B. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY | Principles. In *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*; Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C., Eds.; Elsevier: Oxford, 2005; pp 211–237. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00405-2>.
- (37) Aschauer, U.; Spagnoli, D.; Bowen, P.; Parker, S. C. Growth Modification of Seeded Calcite Using Carboxylic Acids: Atomistic Simulations. *J. Colloid Interface Sci.* 2010, 346 (1), 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.02.057>.
- (38) Bewernitz, M. A.; Gebauer, D.; Long, J.; Cölfen, H.; Gower, L. B. A Metastable Liquid Precursor Phase of Calcium Carbonate and Its Interactions with Polyaspartate. *Faraday Discuss.* 2013, 159 (0), 291–312. <https://doi.org/10.1039/C2FD20080E>.
- (39) Wolk, S. K.; Swift, G.; Paik, Y. H.; Yocom, K. M.; Smith, R. L.; Simon, E. S. One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Poly(aspartic acid) Prepared by Thermal Polymerization of L-Aspartic Acid. ACS Publications. <https://doi.org/10.1021/ma00104a016>.
- (40) Németh, C.; Gyarmati, B.; Abdullin, T.; László, K.; Szilágyi, A. Poly(Aspartic Acid) with Adjustable PH-Dependent Solubility. *Acta Biomater.* 2017, 49, 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.065>.
- (41) Pivcová, H.; Saudek, V.; Drobník, J.; Vlasák, J. Nmr Study of Poly(Aspartic Acid). I. α - and β -Peptide Bonds in Poly(Aspartic Acid) Prepared by Thermal Polycondensation. *Biopolymers* 1981, 20 (8), 1605–1614. <https://doi.org/10.1002/bip.1981.360200804>.
- (42) Pivcová, H.; Saudek, V.; Schmidt, P.; Hlavatá, D.; Pleštil, J.; Lauprêtre, F. Conformation of Poly(Glutamic Acid) and of Poly(Aspartic Acid) in the Solid State. X-Ray Diffraction, Infra-Red and ¹³C Cross-Polarization/Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Study. *Polymer* 1987, 28 (6), 991–997. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(87\)90175-3](https://doi.org/10.1016/0032-3861(87)90175-3).
- (43) Von Euw, S.; Ajili, W.; Chan-Chang, T.-H.-C.; Delices, A.; Laurent, G.; Babonneau, F.; Nassif, N.; Azaïs, T. Amorphous Surface Layer versus Transient Amorphous Precursor Phase in Bone – A

Case Study Investigated by Solid-State NMR Spectroscopy. *Acta Biomater.* 2017, 59, 351–360.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.040>.

Conclusion générale

Les phénomènes de biominéralisation sont très complexes et ne font généralement pas l'objet d'un consensus au niveau de la communauté scientifique. Dans ce manuscrit, nous nous intéressons particulièrement à la compréhension des premières étapes de formation de l'hydroxyapatite, composant majoritaire du tissu osseux. Ce dernier est une ultrastructure composite composée de plaquettes d'hydroxyapatite imbriquée dans une matrice tridimensionnelle de fibrille de collagène. Ajoutons qu'outre les multiples composantes ioniques du plasma sanguin, de nombreuses protéines et cellules sont suspectées d'intervenir tout au long de la vie du minéral osseux qui se forme et se dégrade de manière périodique selon le phénomène de remodelage osseux. Enfin, la densité de ce matériau rend l'étude de sa formation originelle très complexe. Ceci étant dit, il a été proposé, selon des études *in vivo* et *in vitro*, que l'hydroxyapatite, phase minérale du tissu osseux, cristallisait selon un mécanisme en plusieurs étapes impliquant probablement une phase amorphe. Récemment, en 2010, des clusters solubles précédant la nucléation de phosphate de calcium amorphe ont été observés *in vitro*, les PNC, ajoutant une nouvelle dimension différenciant des mécanismes de nucléations classiques. Ces PNC sont solubles, de taille nanométrique et s'agrègent de manière dynamique, si bien que la caractérisation de ces espèces est très complexe (il n'y a que très peu d'études expérimentales à leur sujet) et nécessite des méthodes de caractérisation bien spécifiques.

Ce travail de thèse portait sur l'étude des étapes de prénucléation et de nucléation de l'hydroxyapatite biomimétiques dans l'objectif de, potentiellement, mieux comprendre les phénomènes de biominéralisation osseuse.

Pour cela, nous avons employé des conditions de précipitation proches de la physiologie consistant à utiliser des concentrations faibles (de l'ordre du mM) en ions phosphates et calcium, à un pH proche de la neutralité (~7,4), à température ambiante et en fixant la force ionique à celle du plasma sanguin (~150 mM). Nous nous sommes rendus compte que de faibles variations de n'importe lequel de ces paramètres induisaient une modification de la quantité de clusters de prénucléation formés, et que cette dernière grandeur était intimement liée à la cinétique de nucléation car ces deux grandeurs entretiennent une relation inversement proportionnelle. Par ailleurs, ces clusters de prénucléation semblent avoir la même composition dans ces conditions proches de la physiologie, que l'on soit en excès d'ions phosphates ou d'ions calcium ainsi que dans des conditions de pH plus ou moins acides/basiques que la neutralité. En rationalisant ces observations, il nous a été possible de contrôler à la fois la quantité et le temps de vie des PNC, de manière à les étudier plus finement. Les tendances déterminées se sont vues être en accord avec la stabilité « infinie » de clusters de prénucléation dans une solution métastable mimant la composition ionique du plasma sanguin.

En effet, l'aspect novateur de cette thèse consistait à appliquer des méthodes avancées et adaptées de RMN de manière à caractériser la dynamique et la structure des espèces intermédiaires impliquées dans la formation non-classique d'hydroxyapatite. En particulier, nous avons contribué à développer l'utilisation de la MAS-DNP sur des solutions vitrifiées, qu'il s'agisse d'étudier des spins $\frac{1}{2}$, tels que les noyaux ^1H , ^{13}C et ^{31}P , ou un noyau quadripolaire, le ^{43}Ca . Appliquée à l'étude des clusters de prénucléation, cette méthodologie était similaire à l'utilisation du cryo-TEM, car elle s'appliquait à vitrifier des solutions à des temps bien définis de manière à :

- Grandement réduire, voire stopper la cinétique de ces systèmes hors-équilibres.
- Bénéficier du gain de sensibilité prodigué par l'hyperpolarisation.
- Caractériser la structure de ces espèces transitoires.

Cette approche originale a permis de décrire la structure des clusters de prénucléation comme des ions calcium triphosphates de formule chimique $[\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)]^{3-}$.

Par ailleurs, ce travail de thèse s'est appuyé sur de nombreuses techniques de caractérisation résolues temporellement pour étudier la structure des différentes espèces transitoires précédant la formation d'HAP. Les expériences de potentiométrie du calcium et de suivis pH au cours de précipitations a notamment permis de déterminer *i)* la quantité d'ions calcium liés, *ii)* la quantité de protons relargués par les phosphates dans les espèces transitoires et *iii)* la cinétique de précipitation. En conditions purement inorganiques, nous avons pu détecter 4 étapes distinctes dans le mécanisme de formation d'HAP. De ce fait, nous avons pu détailler ces étapes différentes en réalisant des observations par microscopie électronique résolues temporellement, le cryo-TEM. En particulier, nous avons pu distinguer les évènements suivants :

- La prénucléation où nous observons des PNC d'environ 1 à 2 nm en taille.
- La nucléation de sphères amorphes de plus de 100 nm en taille constituées de clusters solides d'environ 1 à 2 nm en taille : les clusters de postnucléation.
- L'évolution des sphères amorphes en une phase transitoire consistant en des agrégats de plaquettes présentant une morphologie floculaire.
- La cristallisation de plaquettes d'hydroxyapatite biomimétique dont les dimensions varient entre 50—200 nm de longueur et 30—50 nm de largeur.

Pour caractériser la structure de ces espèces transitoires, nous avons largement utilisé la RMN *in situ* en solution au cours de la précipitation de solutions minéralisantes, de manière à suivre la consommation d'ions phosphates et d'ions sodium au cours de la précipitation. Combinant ces analyses ensemble, ainsi qu'avec la potentiométrie du calcium et le suivi du pH, il nous a été possible de déterminer la composition et l'état de protonation des différentes espèces transitoires solides. Cette étude a notamment été appuyée par des expériences de RMN du solide *in situ* et *ex situ* sur ces phases dans leur état natif ou stabilisées dans de l'éthanol absolu.

En particulier, nous proposons que les clusters de postnucléation, briques unitaires des sphères amorphes, se forment à partir de deux PNC et consistent en des clusters de $\text{Ca}_4\text{Na}_4(\text{HPO}_4)_6$. Ces agrégats sphériques évoluent ensuite vers une phase transitoire qu'il a été difficile de caractériser en profondeur. Nos résultats suggèrent toutefois que cette dernière consiste en une phase précurseur de l'hydroxyapatite de composition variable $[\text{Ca}_{6+n}(\text{HPO}_4)_4(\text{PO}_4)_2]^{-2+2n}$ (où $0 \leq n \leq 2$) dont la charge pourrait être contrebalancée par des cations monovalents ou des anions monovalents tels que des ions OH^- . Cette phase pré-apatitique se transformerait ensuite en hydroxyapatite vraisemblablement biomimétique, car nous avons détecté une couche de surface amorphe. Par ailleurs, nos analyses de composition basée sur des méthodes potentiométriques et spectroscopiques en solution ont permis de décrire la couche amorphe de surface comme ayant un rapport Ca/P de 1,42 et présentant un état de protonation composé de 33% d'ions PO_4^{3-} pour 67% d'ions HPO_4^{2-} . Enfin, les analyses par RMN ^{31}P de cette phase dans son environnement aqueux natif suggèrent que cette phase semble cristalline en solution, présentant une signature spectrale proche de la brushite ou de l'OCP sans pour autant être ces phases *stricto sensu*.

Ce type de méthodologie, mêlant analyses de composition par potentiométrie du calcium, suivi du pH et RMN *in situ* en solution, observations par cryo-TEM et analyse structurale par RMN du solide a été appliquée à l'étude de l'influence de l'acide polyaspartique sur la précipitation d'hydroxyapatite.

En effet, nous avons remarqué que cet additif, largement utilisé pour mimer l'action des protéines *in vivo*, modifiait le mécanisme de formation de l'hydroxyapatite, passant d'un mécanisme en 4 étapes à un mécanisme en 3 étapes dans lequel :

- Les espèces de prénucléation interagissent avec les chaînes d'acide polyaspartique.
- Les agrégats de postnucléation se forment en réseau de nanoparticules stabilisées par les chaînes du polymère. Ces nanoparticules s'agrègent en sphères bien plus petites qu'en conditions purement inorganiques (≥ 100 nm), leur taille variant entre 5 et 1 nm selon les proportions relatives d'acide polyaspartique et d'ions calcium.
- Les nanoparticules semblent s'attacher de manière orientée avant de se transformer en plaquettes d'hydroxyapatite, moins larges qu'en conditions purement inorganiques.

Nous nous sommes ensuite employés à décrire l'interaction du polymère avec toutes les espèces transitoires préliminaires à l'hydroxyapatite dans ces conditions. Tout d'abord, nous avons mis en évidence le régime de complexation des ions calcium avec les chaînes d'acide polyaspartique consistant en des complexes ioniques d'1 ion Ca^{2+} pour 6 résidus d'acide aspartique provenant certainement de six chaînes différentes d'acide polyaspartique, prouvant ainsi que les PNC pourraient très bien interagir avec ce polymère chargé négativement. Cela a ensuite été prouvé sur des solutions contenant des PNC par des expériences de recouplage dipolaire par MAS-DNP. La composition et la structure des clusters de postnucléation ont été déterminées par RMN *in situ* en solution des noyaux ^{31}P , ^{43}Ca et ^1H de manière à suivre les consommations respectives en ions phosphates, calcium et en acide polyaspartique au cours de la précipitation, ainsi que par RMN du solide. Cela nous a permis de décrire la structure modifiée des clusters de postnucléation arrangées en réseaux de nanoparticules amorphes, comme des clusters de formule $[\text{Ca}_3\text{PO}_4\text{-Asp}_2]^+$. Enfin, des expériences de recouplage dipolaire démontrent que seule la couche de surface amorphe de l'hydroxyapatite précipitée en présence d'acide polyaspartique interagit avec cette dernière. En conclusion, cet additif mimant les protéines acides *in vivo* interagit avec toutes les espèces transitoires, solubles ou solides, de l'hydroxyapatite, mais pas cette dernière.

Nous avons démontré que la RMN permettait de mieux comprendre les phénomènes de nucléation et de cristallisation à l'échelle atomique. Sa combinaison avec des méthodes résolues temporellement permet d'obtenir des informations inédites concernant la cinétique, la composition et la structure des PNC. Il convient par la suite d'aller plus loin dans ces analyses en combinant nos données à des simulations de dynamique moléculaire et des observations en temps réel par LP-TEM. Si cela a été initié, ces expériences complémentaires permettraient par exemple d'obtenir des distances interatomiques et de mieux comprendre les phénomènes non-classiques. Par ailleurs, l'étude de noyaux supplémentaires par RMN (par exemple ^{17}O ou ^2D) permettrait d'obtenir des informations plus précises sur la dynamique. Passer sur des systèmes biologiques modèles permettant d'étudier la formation d'hydroxyapatite *in vivo* représenterait certainement la prochaine étape pour mieux comprendre la biominéralisation osseuse. Par exemple, certains organismes ont la capacité de régénérer certains de leurs organes tels que la nageoire caudale du poisson zèbre ou les appendices ravisseurs de la squille multicolore. Enfin, les méthodes par RMN hyperpolarisées à l'état solide ou liquide sont des techniques qui ont un grand potentiel pour étudier ces phénomènes hors équilibres qu'il convient ainsi de développer.

**Annexe – Article 2 : Formation and Evolution of
Nanoscale Calcium Phosphate Precursors under
Biomimetic Conditions**

Formation and Evolution of Nanoscale Calcium Phosphate Precursors under Biomimetic Conditions

Ludovica M. Epasto,^{||} Tristan Georges,^{||} Albina Selimović, Jean-Michel Guigner, Thierry Azaïs,* and Dennis Kurzbauch*



Cite This: *Anal. Chem.* 2021, 93, 10204–10211



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

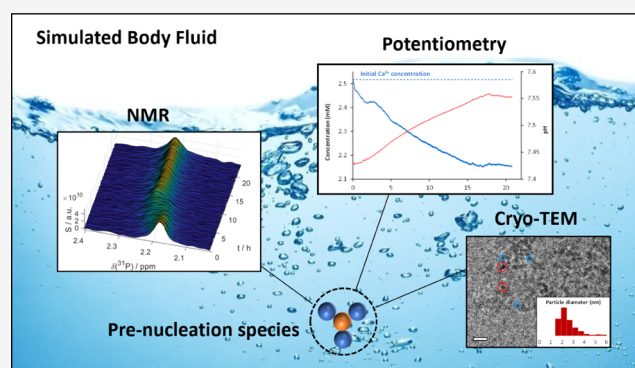


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Simulated body fluids (SBFs) that mimic human blood plasma are widely used media for *in vitro* studies in an extensive array of research fields, from biomineralization to surface and corrosion sciences. We show that these solutions undergo dynamic nanoscopic conformational rearrangements on the timescale of minutes to hours, even though they are commonly considered stable or metastable. In particular, we find and characterize nanoscale inhomogeneities made of calcium phosphate (CaP) aggregates that emerge from homogeneous SBFs within a few hours and evolve into prenucleation species (PNS) that act as precursors in CaP crystallization processes. These ionic clusters consist of ~2 nm large spherical building units that can aggregate into suprastructures with sizes of over 200 nm. We show that the residence times of phosphate ions in the PNS depend critically on the total PNS surface. These findings are particularly relevant for understanding nonclassical crystallization phenomena, in which PNS are assumed to act as building blocks for the final crystal structure.



INTRODUCTION

Biomineralization is defined as the ability of living organisms to produce mineral phases embedded mostly in calcified tissues such as bone and teeth of vertebrates.^{1–3} Beyond its fundamental aspect, its understanding is also of imminent interest for developing nature-inspired materials with tailored properties such as improved bone implants⁴ or functional materials.^{5,6} In this context, simulated body fluids (SBFs) that mimic the ionic composition of human blood plasma^{7,8} are ubiquitous and used in a wide array of research fields, from the design of bone graft materials^{9,10} and tissue engineering^{11,12} to corrosion and biodegradation studies^{13–15} to bioinspired material design.^{16,17} In particular, SBF plays a crucial role as it is the most widespread biomimetic medium used to assess the bioactivity of materials.^{18–20} Notwithstanding its frequent use, the “nanostructure” of SBF remains unsolved to large degrees. A deeper understanding of the structural dynamics is yet essential due to the influence of solvent properties on mineralization and crystallization phenomena.^{21,22} Indeed, environmental conditions often determine the morphology of solid phases precipitating from solution.

In this regard, SBFs have gained particular attention as a result of the recent observation of so-called prenucleation species (PNS) and their involvement in the early onset of biomimetic calcium phosphate (CaP) precipitation (e.g., hydroxyapatite).^{23,24} These PNS are highly dynamic nano-

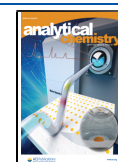
metric ionic clusters that spontaneously form in solution preceding the precipitation of solid crystalline phases.²⁵ Today, PNS have been documented for CaP^{21,23,26–29} and carbonates,^{30–33} as well as for iron oxides.³⁴ Interestingly, their involvement in the formation of biominerals challenges the long-standing nucleation-and-growth paradigm,^{35,36} which has stimulated an ongoing update of the existing crystallization theories.^{26,37,38}

In addition, it has been suggested that the PNS structure and dynamics determine the crystallization path a material takes.²² Hence, a better understanding of PNS behavior in SBFs promises new avenues for the rational design of solid biomimetic ceramics via control over the initial reaction conditions that regulate the molecular architecture of the final material. However, the structure and dynamic behavior of PNS (in particular in SBF) remain poorly understood, and the factors that control the associated nucleation events remain unclear, leaving significant gaps in the current understanding of crystallization.^{39,40}

Received: April 13, 2021

Accepted: June 25, 2021

Published: July 12, 2021



Indeed, the highly dynamic behavior of SBFs and its ionic constituents is challenging to characterize experimentally from both, structural and dynamical, viewpoints. To overcome this bottleneck, we here present an integrative approach, including the first observation of PNS by real-time nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in solution combined with cryoelectron microscopy and calcium potentiometric measurements. We shed light on the constitution of SBFs at the nanoscale, revealing dynamical and structural inhomogeneities therein and thus providing a significant advancement in their understanding.

In particular, we show how SBF undergoes defined and irreversible molecular rearrangements with time, challenging the long-standing notion of its (meta)stability.^{23,41,42} We find that nanometric CaP clusters with diameters of ca. 2 nm form within 5 h after preparing the fresh SBF. We identify these clusters as previously described CaP-based PNS.²³ Subsequently, these PNS can aggregate to form soluble suprastructures of several hundreds of nanometers in size that might precede the precipitation of solid CaP. We find calcium triphosphate units to be the basic units of the PNS. Furthermore, we characterize the exchange kinetics of phosphates between PNS-bound and free states, demonstrating that the frequency of exchange depends critically on the quantity of PNS in solution.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Sample Preparation. Modified SBFs (mSBFs) were prepared following the protocol by Oyane et al.^{43,44} In brief, neat water was stirred at 37 °C, and the salts constituting mSBF were added successively to achieve concentrations comparable to those found in human blood plasma and in particular, a P_i concentration of 1 mM. After the addition of all the salts, the pH was adjusted to 7.4 using 1.0 M NaOH. After preparation, the mSBF was immediately transferred to an NMR tube, and 10% v/v D₂O was added as the lock solvent.

NMR Spectroscopy. All NMR data were acquired at 37 °C on a Bruker NEO NMR spectrometer operating at 11.7 T (500 MHz proton Larmor frequency) equipped with a 5 mm Bruker Prodigy BBO cryoprobe. For real-time detection, 1D ³¹P NMR spectra were acquired every 7.5 min by averaging 64 flame-ionization detectors (FIDs). For detection, 90° flip-angle pulses were applied with a length of 12 μs every 5 s. Prior to Fourier transformation, all data were zero filled and apodized using a Gaussian window function. Subsequent to Fourier transformation, all data were baseline-corrected. To extract signal intensities, the NMR signals were fitted to two Lorentzian functions using home-written scripts embedded in the MATLAB software package using the “fitNlorentzian” function.

For diffusion ordered spectroscopy (DOSY), the spectra were acquired using the dsteppg3s pulse sequence⁴⁵ embedded in the Bruker TopSpin 4 pulse sequence library. The spectra were acquired over 5h15 by averaging 150 FIDs. For detection, 90° flip-angle pulses were applied with a length of 12 μs every 10 s. A six-step z-gradient ramp was used with 2, 14, 25, 37, 48, and 60% of the maximum gradient strength.

Data were analyzed using the GNAT software package⁴⁶ for MATLAB. Prior to Fourier transformation, all data were zero-filled and apodized using a Lorentzian window function. Subsequent to Fourier transformation, all data were baseline-corrected. Diffusion coefficients were extracted using mono-exponential fits to the Stejskal–Tanner equation.⁴⁷

Calcium Ion Potentiometry. Calcium concentration and pH were monitored using a calcium-sensitive electrode (Ca-ISE, Metrohm) and a pH glass electrode (Unitrode, Metrohm) connected to a Titrando titration device (Metrohm) and analyzed with Tiamo software (Metrohm). The Ca-ISE was calibrated at room temperature using three modified SBF-like solutions with respective calcium concentrations of 0.1, 1, and 3 mM. These m-SBF-like solutions were synthesized by following the procedure of Oyane et al.^{43,44} omitting phosphate salts. For each solution, the potential (in millivolts) was measured and automatically fitted to the Nernst equation with a least-square algorithm. The pH electrode was calibrated using three buffered solutions at pH 4, pH 7, and pH 9 (Metrohm). Sample evolution was monitored for 24 h recording potential every 10 s under gentle stirring.

Cryoelectron Microscopy and XEDS. m-SBF solutions were vitrified at specific time points after preparation (1, 5.5, and 23 h). The morphology and the size of nanoparticles were determined from cryotransmission electron microscopy (cryo-TEM) images. A drop (3 μL) of solution was deposited on “quantifoil” (Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany) carbon membrane grids. The excess of the liquid on the grid was absorbed with a filter paper, and the grid was quenched quickly in liquid ethane to form a thin vitreous ice film. The samples were transferred in the microscope and observed at low temperature (−180 °C). Cryo-TEM images were recorded on ultrascan 1000, 2k × 2k CCD camera (Gatan, USA), using a LaB₆ JEOL JEM2100 (JEOL, Japan) cryomicroscope operating at 200 kV with a JEOL low-dose system (Minimum Dose System, MDS) to protect the thin ice film from any irradiation before imaging and reduce the irradiation during the image capture.

X-ray energy-dispersive spectra (XEDS) characterizing the elemental composition of the samples have been recorded with a JEOL (Japan) XEDS detector with 140 eV resolution using a JEOL (Japan) 2100F, field-emission gun instrument operating at 200 kV under cryo-conditions. Images were recorded on an UltraScan 4000 Gatan (USA) camera with a 4096 × 4096 charge-coupled device.

■ RESULTS AND DISCUSSION

In the following, we will first describe the formation and internal dynamics of PNS in SBFs by employing real-time NMR. Second, we describe the PNS constitution by means of transmission electron microscopy (TEM) and potentiometric experiments.

We want to stress that we herein collectively term all CaP aggregates that occur in solution during the early onset of CaP precipitation, for the sake of generality, prenucleation species or “PNS”. This notion should here be understood as neutral, that is, as not referring to any nucleation or crystallization theory.^{26,37–39}

Real-Time NMR of the Evolving SBF. We initially observed the formation and evolution of PNS by real-time NMR of the modified SBF^{43,44} (mSBF which provides improved pH stability over neat SBF). Capitalizing on the strong dependence of the chemical shift of phosphate ions on their local environment, these experiments could distinguish the signals of phosphates bound in a PNS from free phosphates in solution. They revealed that PNS form within 5 h after preparing fresh mSBF and undergo continuous changes throughout a 15 h period.

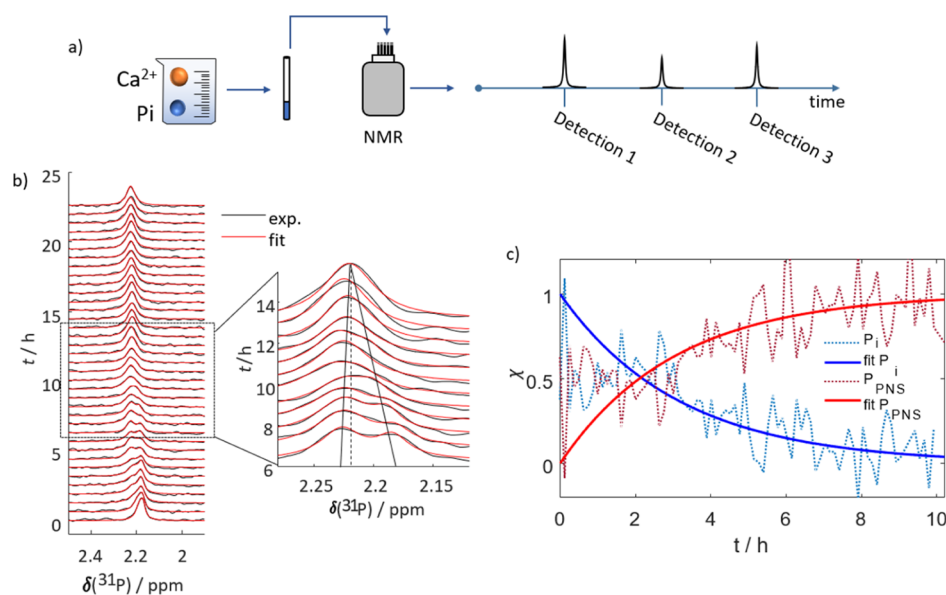


Figure 1. Monitoring of PNS formation in mSBF through real-time NMR. (a) Scheme of experimental workflow. The evolution of PNS at 37 °C in mSBF is traced by consecutive detections of ^{31}P spectra. (b) ^{31}P NMR signals detected for mSBF over a period of 24 h (black) and corresponding fits to two Lorentzian functions (red). Initially, only a single resonance can be observed. After ~ 5 h, a second peak appears. Between 8 and 10 h, the first and second peaks merge, forming a single signal. The insert highlights the transition period during which the two signals merge. The resulting single line resonates at a frequency between those of the precursor signals. At $t > 15$ h, again, only a single line is visible. Note that the spectra are normalized. (c) Time-dependence of the fractional contribution χ of the two lines to the overall spectrum. The contribution of free phosphate is shown in blue and that of PNS-bound phosphate in red. The dotted lines indicate the experimental data, while the solids lines represent fits of the experimental data to monoexponential functions. After 10 h, the signals merged and the two contributions could not be separated anymore.

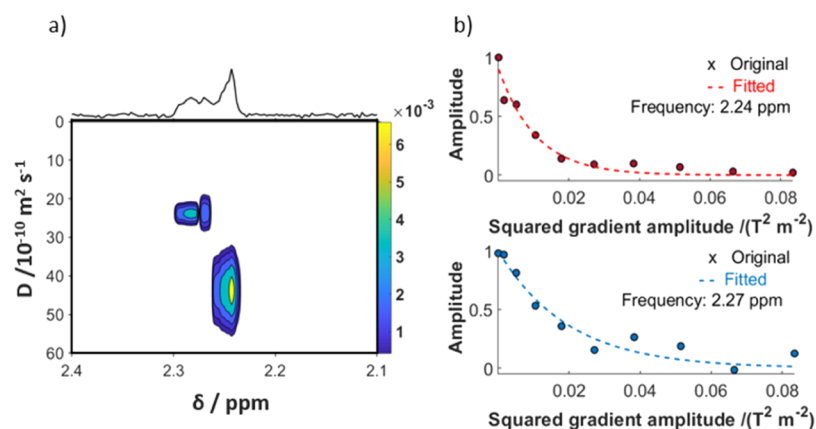


Figure 2. DOSY analysis of mSBF. (a) Mapped diffusion coefficients in dependence of the chemical shift. When both the P_i and the P_{PNS} signals, appear well-separated in the ^{31}P NMR spectra, DOSY of the system allows one to discern two phosphate species via their diffusion coefficients. A slower diffusion coefficient is observed for the species underlying P_{PNS} (left) compared to the signal underlying P_i (right). The diffusion coefficients were $\sim 24 \times 10^{-10}$ vs $\sim 43 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectively. The data were acquired at 37 °C for 5 h at a phosphate concentration of 5 mM. (b) Monoexponential fits of the two DOSY profiles underlying the data in panel (a). The P_{PNS} signal decays slower with increasing gradient amplitude than the P_i signal.

We recorded a series of ^{31}P NMR spectra, as outlined in Figure 1a, starting immediately after the sample preparation. Figure 1b shows the resulting spectra (black lines) and superimposed fits (red lines) to two Lorentzian functions that model the NMR line shape (see the Experimental Section for details). At $t = 0$, a single resonance at 2.18 ppm is detectable, corresponding to free inorganic phosphate (P_i) dissolved in mSBF similar in position and linewidth to the control experiment (Figure S1). After 3–5 h, a second broader peak appears at 2.23 ppm. We assign this signal to emerging PNS (*vide infra*) and denote the involved phosphates henceforth as P_{PNS} . During this period, our fitting routine can quantitatively

reproduce the spectra with only two lines. From 8 to 10 h after preparation, both signals are broadened compared to their initial line width and slowly approach each other.

After 10 h, the signals merge, and only a single line remains at a chemical shift of 2.21 ppm (insert Figure 1b). Notably, the total signal intensity is constant throughout the detection period (up to 30 h), indicating that CaP does not precipitate from mSBF under our conditions ($T = 37$ °C; $\text{pH} = 7.4$) throughout the experiment.

Figure 1c shows the relative fractions χ of the two spectral components of P_i and P_{PNS} of the spectra during the initial

period of evolution. The figure highlights how P_i is consumed to form P_{PNS} .

Diffusion-Ordered Spectroscopy Provides Evidence of PNS. To characterize the two different phosphate species further, we employed DOSY. It showed that the hydrodynamic radius of the PNS is ca. 1.7-fold larger than that of free P_i .

Due to the low signal intensities, these experiments had to be acquired at a P_i concentration of 5 mM (a fivefold increase compared to neat mSBF). However, the results can be safely qualitatively interpreted as, similar to mSBF, two distinct resonances appear after 10 to 15 h of maturation (Figure S2). Figure 2 displays the DOSY analysis of modified mSBF acquired over a 5 h period (10–15 h after sample preparation). Notably, two distinct diffusion coefficients are evidenced. A coefficient of $D = \sim 24 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ could be observed for the single P_{PNS} peak. The P_i signal yielded to a faster coefficient of $\sim 42 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Solving the Stokes–Einstein relation assuming spherical particles, we find that the average hydrodynamic radius R_h of P_{PNS} is ~ 1.7 -fold larger than that of P_i , amounting to ~ 1.0 and ~ 0.6 nm, respectively.

Therefore, the volume of the detected particles is ca. fourfold larger than that of free P_i . Hence, we deduce that the second signal appearing in the ^{31}P spectra in Figure 1 indeed stems from phosphate units embedded in larger ionic clusters that, despite their size, remain in solution, that is, in a PNS.

Theoretical Modeling of the Phosphate Exchange. To better understand the R_h variations and the real-time NMR data, we theoretically modeled our data assuming two-site chemical exchange. We found that the mSBF system passes from a slow to an intermediate to a fast exchange regime with growing PNS concentration. This circumstance causes the apparent spectral changes in the NMR time series.

To form PNS, it is necessary that the phosphates exchanges between the pool of free P_i in solution and the pool of newly bound species P_{PNS} . This process influences the shape of the NMR spectra in Figures 3a (similar to 1b). The time series starts with a single P_i signal, followed by the emergence of a well-distinguishable P_{PNS} signal. Later, both signals first broaden and then merge into a single, again sharp, resonance. This behavior is typical for exchange-driven spectral coalescence.⁴⁸ Figure 3c illustrates how both signals are broadened and reduced in amplitude during the period of intermediate exchange.

We could model this behavior using the Norris equation⁴⁹ for two-site exchange, which can be considered as a simplified version of the Carver–Richards equation⁵⁰

$$\rho_T = \left[-iC \sum_l F_l \right] \left[1 + \left(\frac{1}{\tau} \right) \sum_l F_l \right]^{-1} \quad (1a)$$

$$F_l = n_l \left[i(\omega - \omega_k) - \frac{1}{(T_2)_l} - \frac{1}{\tau} \right]^{-1} \quad (1b)$$

ρ_T is the resulting spectrum, τ stands for the average inverse exchange rate k_{ex} and n_l is the fractional population of the l th site. ω is the resonance frequency and $1/(T_2)_l$ is the line width of the l th species in the absence of exchange. C is an overall proportionality constant assumed here to be 1.

The exchange rate constant $1/\tau$ was modeled by combining the classical collision theory Arrhenius law with a first-order kinetic equation

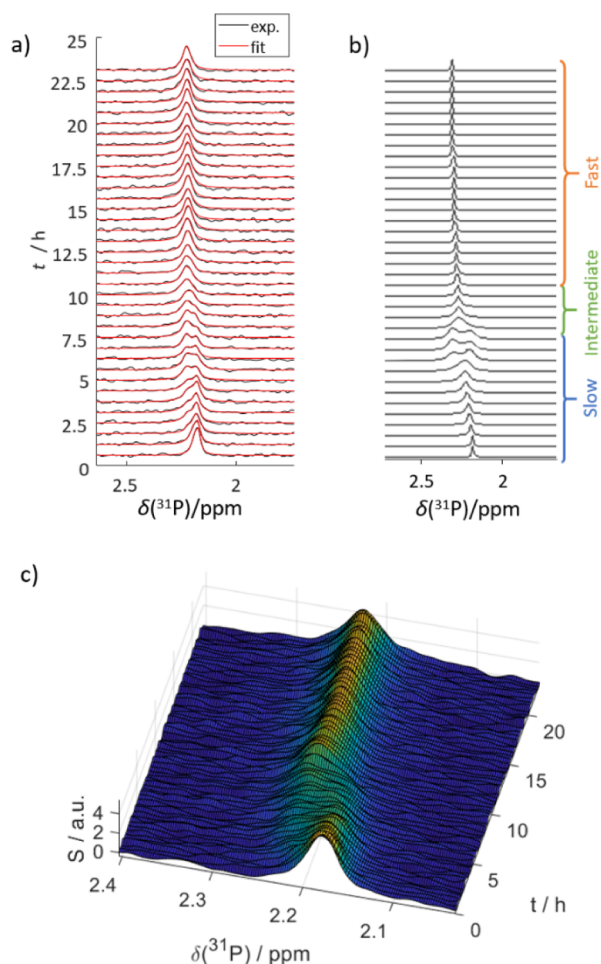


Figure 3. Comparison of (a) experimental results of mSBF evolution at 37 °C with (b) simulated data. The prediction was performed with a dynamic two-site exchange model, as described in the main text. In both, the second species appears at ca. 3–5 h, following the exchange path of the NMR-detected peak. The brackets indicate the different exchange regimes. (c) Non-normalized surface plot of the ^{31}P NMR signal versus time. The representation illustrates that the signals are broadened and reduced in amplitude during the transition from slow to fast exchange.

$$Z = n_{P_i} n_{\text{PNS}} R_{h,\text{PNS}} \sqrt{\frac{8k_b T}{\pi m_{\text{red}}}} \quad (2a)$$

$$1/\tau = Z \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right) \quad (2b)$$

$$\frac{\partial[n_{\text{PNS}}]}{\partial t} = -k[n_{P_i}] \quad (3)$$

where n_{P_i} and n_{PNS} indicate the concentrations of free and PNS-bound phosphates, respectively. $R_{h,\text{PNS}}$ is the estimated radius of hydration of a PNS (assumed to be 1 nm, in line with the DOSY experiments). k_b is the Boltzmann constant, T is the temperature of the system, and m_{red} is the reduced PNS mass. E_A is the activation energy, and R is the gas constant. In eq 3, k is the kinetic constant of the conversion $P_i \rightarrow P_{\text{PNS}}$.

Combining eqs 1a–2a, we could reproduce the experimental data, as shown in Figure 3a,b. At this stage, the following understanding emerges of the exchange processes in mSBF:

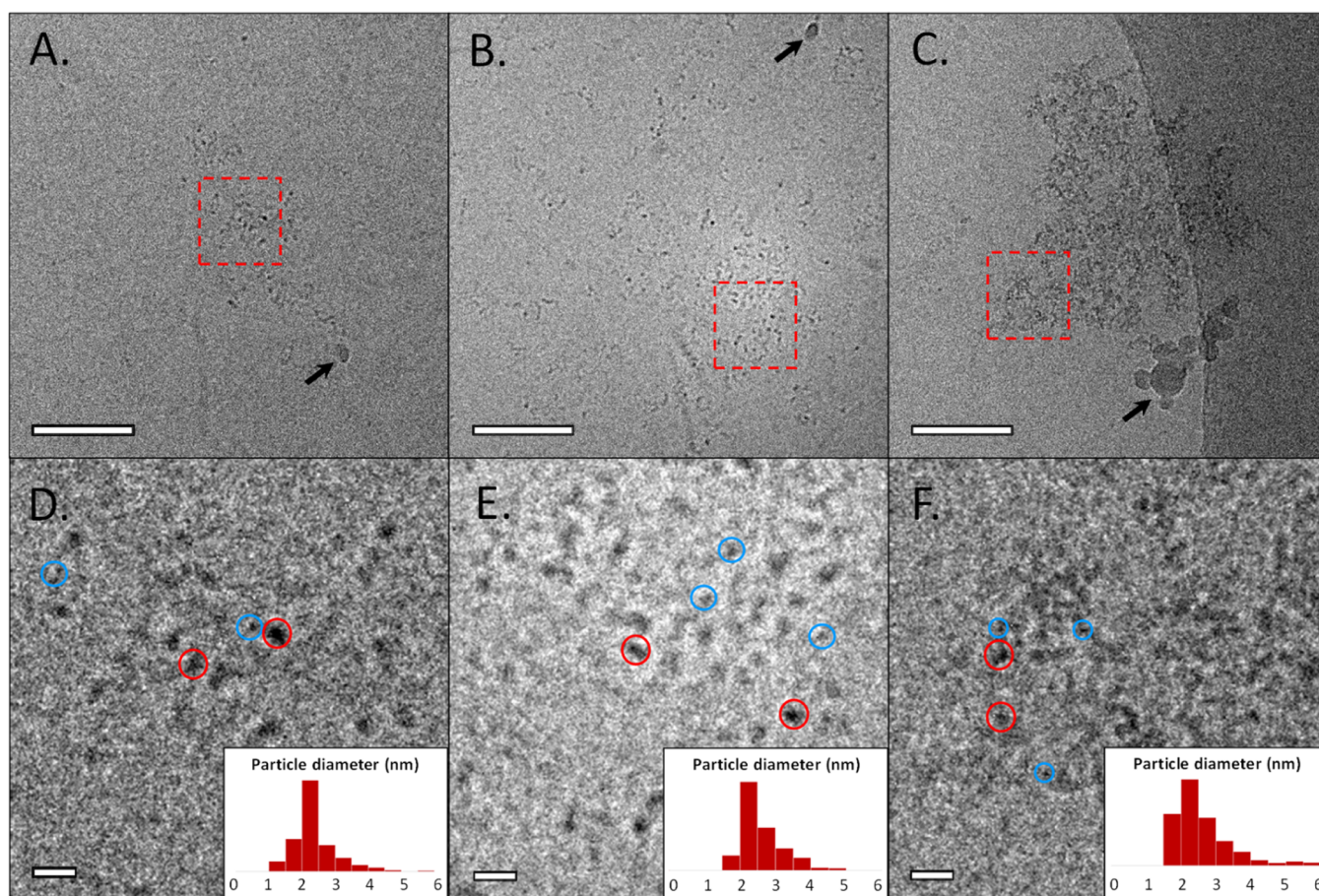


Figure 4. Cryo-TEM observations of mSBF solution at different time points—(A) 1 h, (B) 5.5 h, and (C) 23 h after mSBF preparation, respectively. (D–F) Zoom of the corresponding zones delimited by the red squares in (A–C). Insert displays size evaluation of individual PNS. Blue and red circles give an example of smaller and bigger PNS, respectively. The black arrows indicate the presence of polluting agents, due to the freezing process. Scale bar (A–C) = 50 nm. Scale bar (D–F) = 10 nm.

Initially, aggregation of P_i and Ca^{2+} ions leads to CaP-PNS formation and the emergence of a corresponding second signal. At this time, the system is in slow exchange as the number of PNS is still small, compared to free P_i , such that only a small “exchange surface” is available and a small number of encounters (cf. eqs 2a and 2b; the prefactor n_{PNS} is small, leading to slow exchange rates $1/\tau$). After 5 h, the two peaks broaden as the system undergoes a transition into an intermediate exchange regime, where $\Delta\delta(^{31}P) = 1/\tau = k_{ex}$. In other words, the exchange surface grows together with the number of PNS, n_{PNS} . Finally, the two peaks merge after ca. 15 h, with a chemical shift averaged between the two initial lines (cf. Figure 1b). For this case, the model calculations indicate that the phosphates experience a fast exchange between both states, that is, $\Delta\delta(^{31}P) < 1/\tau$.

The real-time NMR data, diffusion measurements, and theoretical predictions thus suggest a process in which (i) PNS forms in mSBF spontaneously after its preparation and continues to emerge over a time of >15 h, (ii) the diameter of the PNS detected by solution-state NMR is on the order of 2 nm, and (iii) the exchange between freely dissolved and PNS-bound phosphates accelerates when the concentration of PNS grows.

During the slow exchange phase, the chemical shift difference between the two species amounts to 0.05 ppm, which corresponds to an exchange rate of $k_{ex} < 10$ Hz.

Interestingly, earlier studies on CaP precipitation (dicalcium phosphate dehydrate)⁵¹ under nonbiomimetic conditions (pH 8 and ion concentrations >10 mM) reported much higher limits of $k_{ex} < 250$ to 350 Hz, highlighting the importance of environmental conditions for crystallization studies.

Cryo-TEM Analysis Reveals PNS Suprastructures. To further analyze the PNS structure, we performed cryo-TEM observations. Data were acquired 1, 5.5, and 23 h after sample preparation, following the exchange regimes derived by NMR (Figures 4 and S3). After 1 h, we observed the appearance of the first PNS (Figure 4a). The number of PNS visibly increased after 5.5 h (Figure 4b,c), supporting the time-dependent emergence of PNS in the mSBF. After 23 h of maturation, some PNS are found to aggregate into higher-order structures of several hundreds of nanometers including typically ~100 to ~400 PNS (Figure 4c). In addition, free PNS were also observed to coexist in solution (Figure S3).

Higher magnification allows the evaluation of PNS size and distribution (Figure 4d–f). After 1 and 5.5 h, individual PNS with sizes ranging from 1.5 to 3.5 nm were observed in good agreement with the DOSY NMR data. After 23 h, PNS aggregates were found constituted by individual spherical units again with diameters of 1.5–3.5 nm. In addition, bigger units of 4–6 nm in size were found to coexist at this time of maturation (red circles vs blue circles in Figure 4d–f).

The observed aggregates and clusters remain in solution in the mSBF for an extended period before CaP precipitation takes place. Hence, these structures likely define the starting point of the pathway CaP takes toward its solid crystalline state.^{23,24,27}

Note that solution-state NMR is limited to aggregates of a few nanometers due to line-broadening effects for bigger molecular assemblies. It is very likely that the detected P_{PNS} resonance through ^{31}P NMR species do not reflect all PNS observed by cryo-TEM. Larger species might not be detected. The determined R_h of ~ 1 nm through DOSY NMR corroborates this assumption.

EDXS Analysis Reveals Phosphate-Rich PNS. We employed energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXS) of mSBF 23 h after preparation to determine the PNS composition after complete equilibration. In the electron micrograph, we selected a region of $\sim 1 \mu\text{m}^2$ containing a large PNS aggregate (Figure 5a) and another region devoid of any PNS (Figure 5b) as a negative control.

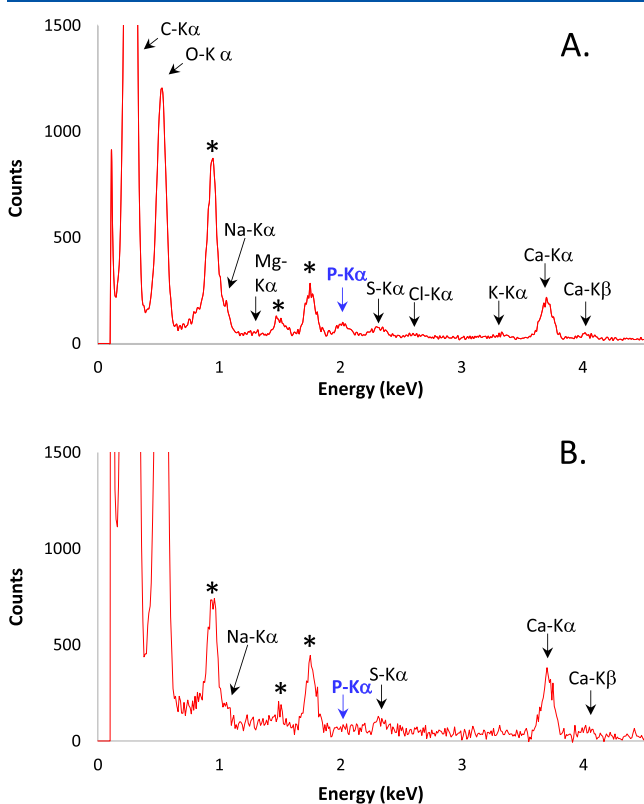


Figure 5. EDXS analysis of the mSBF performed 23 h after preparation. (a) Selected zone contains a large amount of PNS. (b) Selected zone does not contain a significant amount of PNS (Figure S4). The electron beam area is $\sim 1 \mu\text{m}^2$. Black stars at 0.93, 1.49, and 1.74 keV indicate Cu-L α , Al-K α , and Si-K α peaks, respectively, corresponding to the grid, its plasma treatment, or pollution.

The Ca K α and Ca K β peaks are both visible in the absence and presence of PNS. In opposition, the P K α peak is only visible in the presence of PNS, indicating the abundance of phosphorous atoms within the ionic clusters. Interestingly, S K α and Na L α signals (markers of sulfate and Na $^+$), of comparable intensity to the P K α peak, are present in both cases (Figure 5a,b).

Thus, the EDXS results suggest that the mSBF, once equilibrated, is depleted in free P_i , while most phosphate ions are localized within the PNS units. These data are consistent with the ^{31}P NMR data, in which the detected fraction of free P_i is very small at $t > 15$ h.

Ca $^{2+}$ Potentiometry Reveals the PNS Ca/P Ratio. To further corroborate the NMR-derived kinetics and determine the protonation state of the phosphate units, we potentiometrically determined the calcium ion concentration over a period of 21 h following mSBF preparation.

Figure 6 displays the time dependence of the free Ca $^{2+}$ ion concentration throughout our experiments. After mSBF

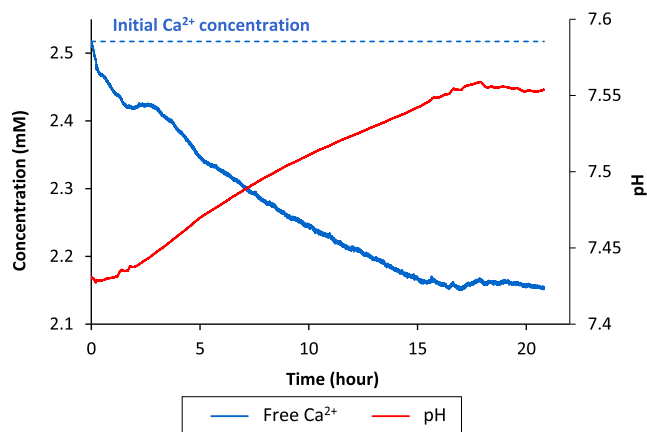


Figure 6. Evolution of free Ca $^{2+}$ concentration (blue curve) and pH (red curve) of mSBF over time. Concentration curves were temperature-corrected to mitigate biases in apparent concentrations.

preparation, the concentration continuously decreases until it reaches a steady state at $t > 16$ h. This decrease results from the uptake of Ca $^{2+}$ ions by the PNS (in line with the NMR and TEM data). The proportion of bound calcium ions after ca. 16 h amounts to 14% of the initial Ca $^{2+}$ concentration, that is, the free ion concentration drops from 2.5 to 2.15 mM (Figure 6). In return, the amount of bound Ca $^{2+}$ is ca. 0.35 mM (Figure S5). Moreover, from the NMR experiments and EDXS analysis, we can estimate the amount of P_{PNS} after 21 h to ca. 1 mM considering that the majority of phosphate ions are embedded in PNS. Thus, we determine that one Ca $^{2+}$ ion interacts with 2.8 (~ 3) P_i , forming PNS as “calcium triphosphate units”.

Interestingly, we also observed a small pH variation strongly correlated with the free Ca $^{2+}$ species (Figure 6). The pH increases from 7.42 to 7.56 ($\Delta\text{pH} = 0.14$), reaching a plateau after 16 h similar to the concentration of free Ca $^{2+}$.

This observation is important as the pH influences the phosphate speciation. The pH values suggest that PNS tend to accommodate both HPO_4^{2-} and H_2PO_4^- ions but with a higher proportion of the latter ($[\text{H}_2\text{PO}_4^-]/[\text{HPO}_4^{2-}] = 0.36$) (Figure S5).

Considering relative contributions of bound H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} of 36% and 64%, respectively, the PNS basic unit amounts to average nominal composition of $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_{1.04}(\text{HPO}_4)_{1.76}]_n^{2.56-}$ (not considering coordinated water molecules), very similar to the calcium triphosphate units proposed by Habraken et al.²⁷

CONCLUSIONS

Our data show that the mSBF is a highly dynamic system that undergoes a continuous transformation after its preparation. It can be considered as stable or metastable only after an extended equilibration period of >24 h. Priorly, the dynamic emergence of CaP PNS continuously changes the nanoscopic constitution of the solution.

Figure 7 summarizes the picture we developed of PNS in the mSBF from individual ions to small clusters to larger

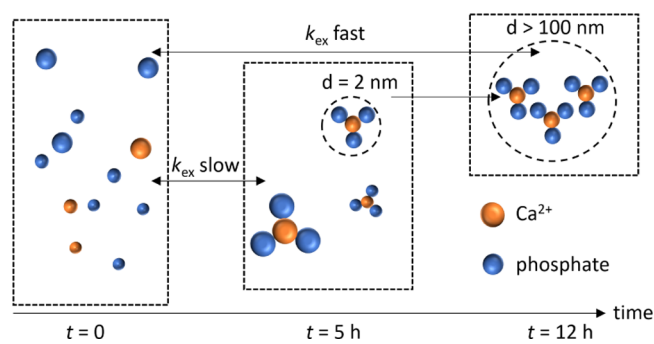


Figure 7. Scheme summarizing the PNS evolution in mSBF. After preparation, the ions are freely dispersed in solution. After 5 h, they aggregate to form CaP species with a diameter of ca. 2–3 nm. The exchange rate of phosphates between free and bound states is slow (on the NMR timescale) at this stage. After 12 h, the CaP clusters can aggregate to form suprastructures of more than 100 nm in size, where individual PNS are still present. The phosphate exchange is fast at this stage. The PNS are constituted by three phosphate units per Ca^{2+} ion.

suprastructures. Initially, PNS solute species of ~ 2 nm in diameter form right after mSBF preparation and experience accelerating phosphate exchange with maturation time. After equilibration, mSBF is found to be depleted of free phosphate as PNS form with an estimated Ca/P molar ratio of 1/3.

Given its widespread use, the understanding of SBF and PNS dispersed therein might be useful in a wide array of research fields. Among other examples, the investigation of nonclassical crystallization pathways in the field of biomineralization or the development of novel bone-graft replacements relies heavily on SBF use.

The combination of NMR, Cryo-TEM, and Ca^{2+} titration thereby provides the possibility of tracing the transformation of P_i into P_{PNS} in real time and quantify the size and composition of PNS. Therefore, the presented integrative methodology might open new avenues for spatiotemporally resolved data sets that enable characterization of nanoscale inhomogeneities in solution and associated crystallization events at an improved level of detail.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.1c01561>.

Reference NMR experiments, supplementary cryo-TEM images, and supplementary potentiometry experiments (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Thierry Azaïs – Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), F-75005 Paris, France; orcid.org/0000-0002-9031-872X; Email: thierry.azais@sorbonne-universite.fr

Dennis Kurzbach – Faculty of Chemistry, Institute of Biological Chemistry, University Vienna, 1090 Vienna, Austria; orcid.org/0000-0001-6455-2136; Email: dennis.kurzbach@univie.ac.at

Authors

Ludovica M. Epasto – Faculty of Chemistry, Institute of Biological Chemistry, University Vienna, 1090 Vienna, Austria

Tristan Georges – Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), F-75005 Paris, France

Albina Selimović – Faculty of Chemistry, Institute of Biological Chemistry, University Vienna, 1090 Vienna, Austria

Jean-Michel Guigner – Institut de Minéralogie et Physique des Milieux Condensés (IMPMC), Sorbonne Université, F-75005 Paris, France

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.1c01561>

Author Contributions

^{||}L.M.E. and T.G. contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge support by the NMR core facility of the Faculty of Chemistry, University of Vienna. The authors thank Dr. Gregory L. Olsen for his support. The project leading to this application received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme (grant agreement 801936). This project was further supported by an FWF standalone grant (no. P-33338 N). T.A. and T.G. thank the CNRS-NTU "Excellence Science" Joint Research Program for funding.

REFERENCES

- (1) Lowenstam, H. A.; Weiner, S. *On Biomineralization*; Oxford University Press, 1989.
- (2) Glimcher, M. J. The Nature of the Mineral Phase in Bone: Biological and Clinical Implications. *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*; Elsevier, 1998; pp 23–52.
- (3) Beniash, E. Biominerals-hierarchical nanocomposites: the example of bone. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology*; Wiley, 2011; Vol. 3, pp 47–69.
- (4) Wang, W.; Yeung, K. W. K. *Bioact. Mater.* **2017**, *2*, 224–247.
- (5) Mann, S. *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*; Oxford University Press, 2001.
- (6) Meldrum, F. C.; Cölfen, H. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4332–4432.
- (7) Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, *24*, 721–734.
- (8) Ohtsuki, C.; Kokubo, T.; Yamamuro, T. *J. Non-Cryst. Solids* **1992**, *143*, 84–92.
- (9) Zou, F.; Jiang, J.; Lv, F.; Xia, X.; Ma, X. *J. Nanobiotechnol.* **2020**, *18*, 39.

- (10) Shin, K.; Jayasuriya, A. C.; Kohn, D. H. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2007**, *83A*, 1076–1086.
- (11) Misra, S. K.; Ansari, T. I.; Valappil, S. P.; Mohn, D.; Philip, S. E.; Stark, W. J.; Roy, I.; Knowles, J. C.; Salih, V.; Boccaccini, A. R. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2806–2815.
- (12) Suárez-González, D.; Barnhart, K.; Saito, E.; Vanderby, R.; Hollister, S. J.; Murphy, W. L. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2010**, *95A*, 222–234.
- (13) Yang, X.; Hutchinson, C. R. *Acta Biomater.* **2016**, *42*, 429–439.
- (14) Jafari, S.; Singh Raman, R. K. *Mater. Sci. Eng., C* **2017**, *78*, 278–287.
- (15) Prabhu, D. B.; Nampoothiri, J.; Elakkiya, V.; Narmadha, R.; Selvakumar, R.; Sivasubramanian, R.; Gopalakrishnan, P.; Ravi, K. R. *Mater. Sci. Eng., C* **2020**, *106*, 110164.
- (16) Kaur, B.; Srivastava, R.; Satpati, B.; Kondepudi, K. K.; Bishnoi, M. *Colloids Surf., B* **2015**, *135*, 201–208.
- (17) Elmi, M. M.; Elmi, F.; Sekineh Khazae, P. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *123*, 817–825.
- (18) Kokubo, T.; Takadama, H. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907–2915.
- (19) Bohner, M.; Lemaître, J. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2175–2179.
- (20) Baine, F.; Yamaguchi, S. *Biomimetics* **2020**, *5*, 57.
- (21) He, K.; Sawczyk, M.; Liu, C.; Yuan, Y.; Song, B.; Deivanayagam, R.; Nie, A.; Hu, X.; Dravid, V. P.; Lu, J.; Sukotjo, C.; Lu, Y.-p.; Král, P.; Shokuhfar, T.; Shahbazian-Yassar, R. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, No. eaaz7524.
- (22) Gebauer, D.; Wolf, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4490–4504.
- (23) Dey, A.; Bomans, P. H. H.; Müller, F. A.; Will, J.; Frederik, P. M.; de With, G.; Sommerdijk, N. A. J. M. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 1010–1014.
- (24) Nudelman, F.; Pieterse, K.; George, A.; Bomans, P. H. H.; Friedrich, H.; Brylka, L. J.; Hilbers, P. A. J.; de With, G.; Sommerdijk, N. A. J. M. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 1004–1009.
- (25) Gebauer, D.; Kellermeier, M.; Gale, J. D.; Bergström, L.; Cölfen, H. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 2348–2371.
- (26) Carino, A.; Ludwig, C.; Cervellino, A.; Müller, E.; Testino, A. *Acta Biomater.* **2018**, *74*, 478–488.
- (27) Habraken, W. J. E. M.; Tao, J.; Brylka, L. J.; Friedrich, H.; Bertinetti, L.; Schenk, A. S.; Verch, A.; Dmitrovic, V.; Bomans, P. H. H.; Frederik, P. M.; Laven, J.; van der Schoot, P.; Aichmayer, B.; de With, G.; DeYoreo, J. J.; Sommerdijk, N. A. J. M. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1507.
- (28) Zhang, Q.; Jiang, Y.; Gou, B.-D.; Huang, J.; Gao, Y.-X.; Zhao, J.-T.; Zheng, L.; Zhao, Y.-D.; Zhang, T.-L.; Wang, K. *Cryst. Growth Des.* **2015**, *15*, 2204–2210.
- (29) Wang, L.; Li, S.; Ruiz-Agudo, E.; Putnis, C. V.; Putnis, A. *CrystEngComm* **2012**, *14*, 6252–6256.
- (30) Gebauer, D.; Völkel, A.; Cölfen, H. *Science* **2008**, *322*, 1819–1822.
- (31) Gebauer, D.; Cölfen, H. *Nano Today* **2011**, *6*, 564–584.
- (32) Pouget, E. M.; Bomans, P. H. H.; Goos, J. A. C. M.; Frederik, P. M.; de With, G.; Sommerdijk, N. A. J. M. *Science* **2009**, *323*, 1455–1458.
- (33) Mohammed, A. S. A.; Carino, A.; Testino, A.; Andalibi, M. R.; Cervellino, A. *Part. Part. Syst. Character.* **2019**, *36*, 1800482.
- (34) Scheck, J.; Wu, B.; Drechsler, M.; Rosenberg, R.; Van Driessche, A. E. S.; Stawski, T. M.; Gebauer, D. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 3123–3130.
- (35) Bonnett, P. E.; Carpenter, K. J.; Dawson, S.; Davey, R. J. *Chem. Commun.* **2003**, *0*, 698–699.
- (36) Peng, Y.; Wang, F.; Wang, Z.; Alsayed, A. M.; Zhang, Z.; Yodh, A. G.; Han, Y. *Nat. Mater.* **2015**, *14*, 101–108.
- (37) Zahn, D. *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 2069–2075.
- (38) Carino, A.; Testino, A.; Andalibi, M. R.; Pilger, F.; Bowen, P.; Ludwig, C. *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17*, 2006–2015.
- (39) Jehannin, M.; Rao, A.; Cölfen, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 10120–10136.
- (40) Wang, L.; Nancollas, G. H. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4628–4669.
- (41) Vekilov, P. G. *Nanoscale* **2010**, *2*, 2346–2357.
- (42) Li, P.; Nakanishi, K.; Kokubo, T.; de Groot, K. *Biomaterials* **1993**, *14*, 963–968.
- (43) Oyane, A.; Kim, H.-M.; Furuya, T.; Kokubo, T.; Miyazaki, T.; Nakamura, T. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2003**, *65A*, 188–195.
- (44) Oyane, A.; Onuma, K.; Ito, A.; Kim, H.-M.; Kokubo, T.; Nakamura, T. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2003**, *64A*, 339–348.
- (45) Jerschow, A. *J. Magn. Reson.* **2000**, *145*, 125–131.
- (46) Castañar, L.; Poggetto, G. D.; Colbourne, A. A.; Morris, G. A.; Nilsson, M. *Magn. Reson. Chem.* **2018**, *56*, 546–558.
- (47) Borkowski, K.; Krzyżak, A. T. *J. Magn. Reson.* **2018**, *296*, 23–28.
- (48) Ernst, R. R.; Bodenhausen, G.; Wokaun, A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*; Clarendon press: Oxford, 1987; Vol. 14.
- (49) Norris, J. R. *Chem. Phys. Lett.* **1967**, *1*, 333–334.
- (50) Carver, J. P.; Richards, R. E. *J. Magn. Reson.* **1972**, *6*, 89–105.
- (51) Weber, E. M. M.; Kress, T.; Abergel, D.; Sewsrn, S.; Azaïs, T.; Kurzbach, D. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 7666–7673.

SUPPORTING INFORMATION

Formation and evolution of nanoscale calcium phosphate precursors under biomimetic conditions

Ludovica M. Epasto^{#,§}, Tristan Georges^{+,§}, Albina Selimović[#], Jean-Michel Guigner,† Thierry Azais^{+,*}, Dennis Kurzbach^{#,*}

[#]University Vienna, Faculty of Chemistry, Institute of Biological Chemistry, Währinger Str. 38, 1090, Vienna, Austria.

⁺Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), 4, place Jussieu, F-75005 Paris, France

[†] Sorbonne Université, Institut de Minéralogie et Physique des Milieux Condensés (IMPMC), 4, place Jussieu, F-75005 Paris, France

[§] These authors contributed equally

*Corresponding authors: DK: dennis.kurzbach@univie.ac.at; TA: thierry.azais@sorbonne-universite.fr

Table of contents

Page

- S2. Figure S1: 1mM P_i + NaCl negative control;
- S3. Figure S2: 5mM P_i in mSBF evolution;
- S4. Figure S3: Cryo-TEM of PNS in mSBF ;
- S5. Figure S4: Cryo-TEM of areas analyzed with EDX;
- S6. Figure S5: bound-Ca²⁺ calculation.

Figure S1

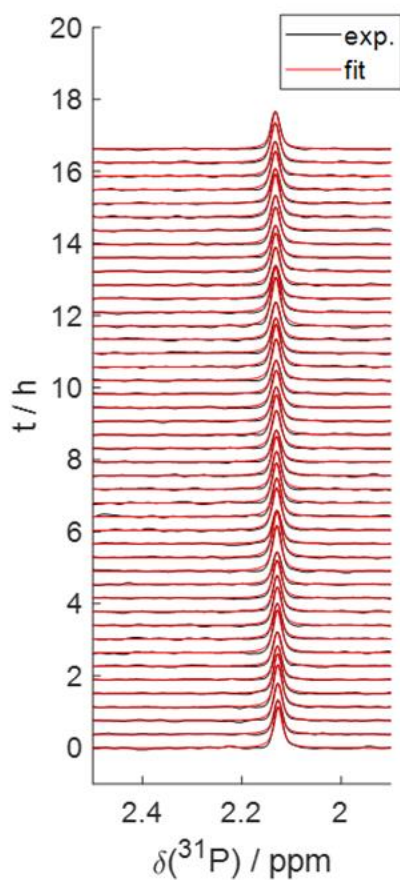


Figure S1. Negative control experiment of 1 mM Pi solution in which all salts (except Pi) from mSBF have been replaced by NaCl at equivalent concentrations to keep ionic strength constant (in HEPES buffer at pH 7.4). The ^{31}P NMR time traces are constant over time and exhibit one single resonance of similar position and line width to mSBF at $t = 0$. This control allows us to assign unambiguously the 2.18 ppm ^{31}P resonance of mSBF to free Pi.

Please note that mSBF solution without Pi cannot be used as a control because of calcite precipitation in these conditions (see Oyane *et al. J. Biomed. Res. A* **2003**, 64A, 339-348).

Figure S2

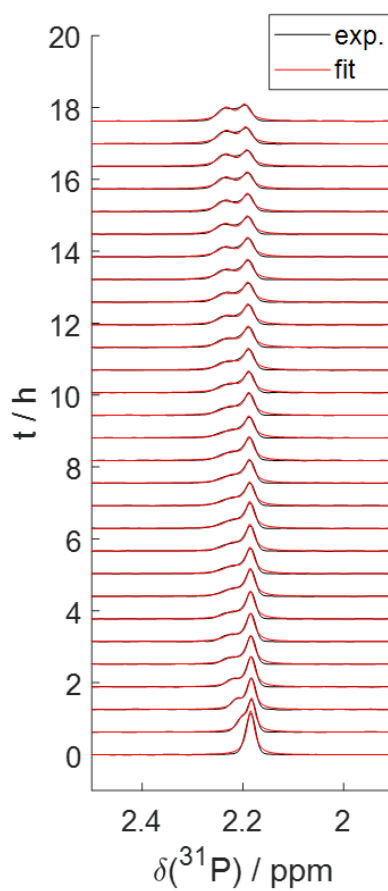


Figure S2. ^{31}P NMR time traces of 5 mM P_i in mSBF as used in the DOSY experiments. The evolution is qualitatively the same as in the case of neat mSBF. However, the evolution is slowed down due to the excess in phosphate, which enables the detection of longer DOSY experiments in the slow exchange regime.

Figure S3

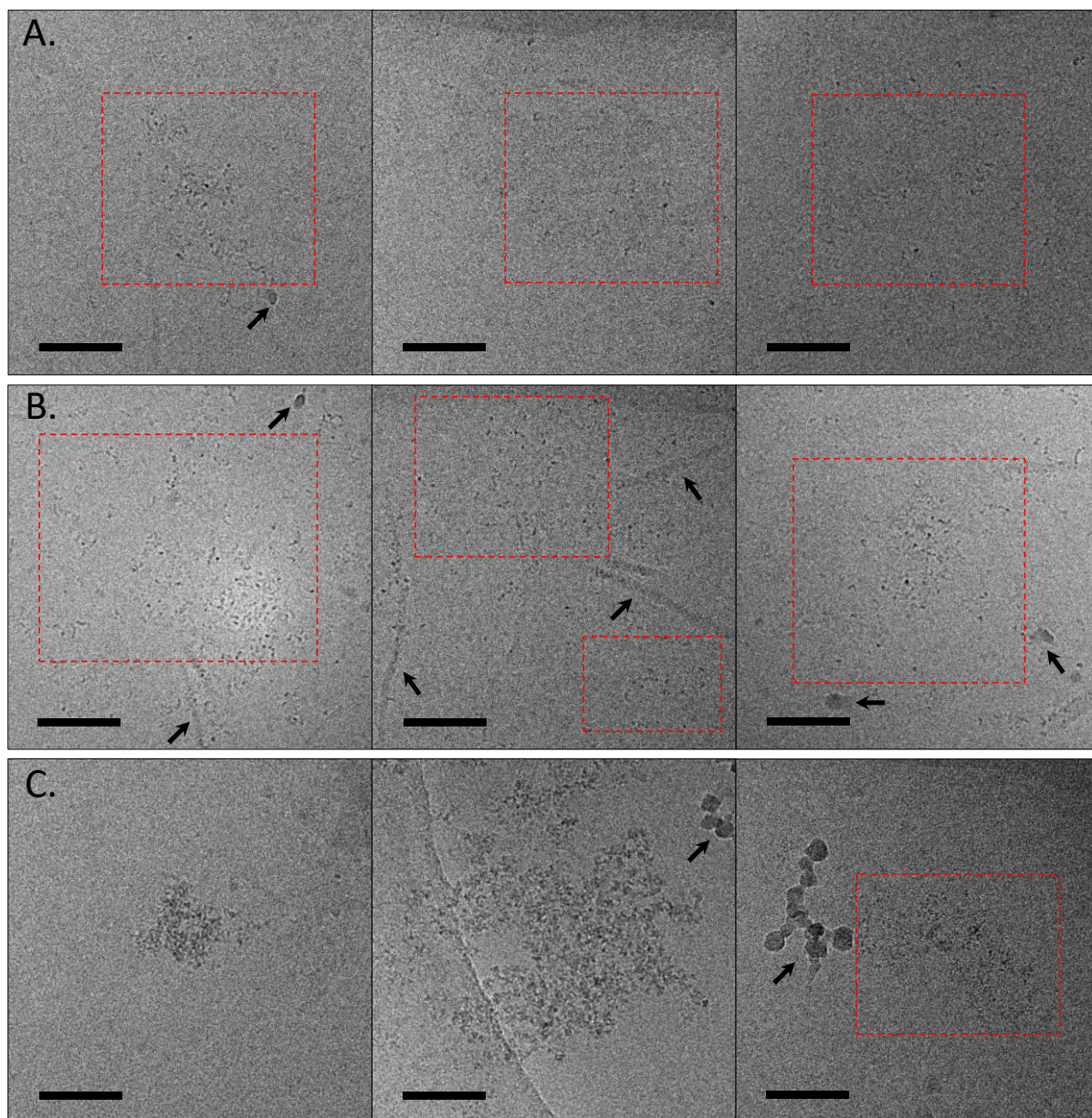


Figure S3. Evolution of PNS formation in mSBF over time revealed through cryo-TEM. (a) 1h, (b) 5.5h and (c) 23h after preparation. Scale bars = 50 nm. Red rectangles surround PNS units, black arrows point pollutions due to the freezing process, the plasma treatment of the grid or the solution container

Figure S4

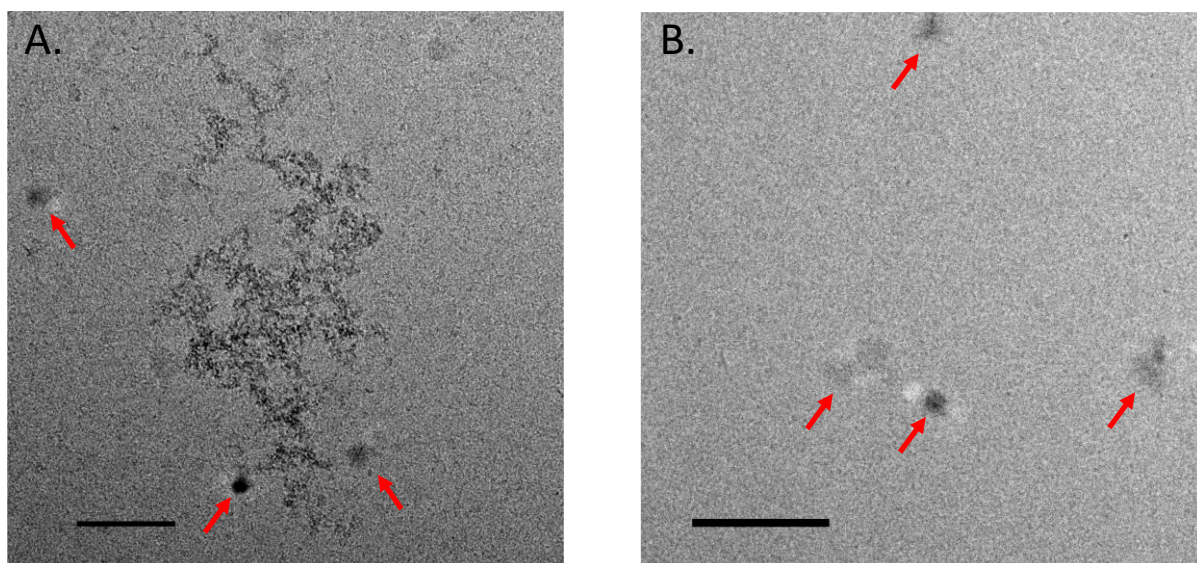


Figure S4. Cryo-TEM micrographs corresponding to the zones analyzed through EDX. (A) zone containing PNS. (B) zone empty of PNS (B.). Scalebar = 100 nm. Red arrows exhibit pollutions due to the freezing process and the plasma treatment of the grid.

Figure S5

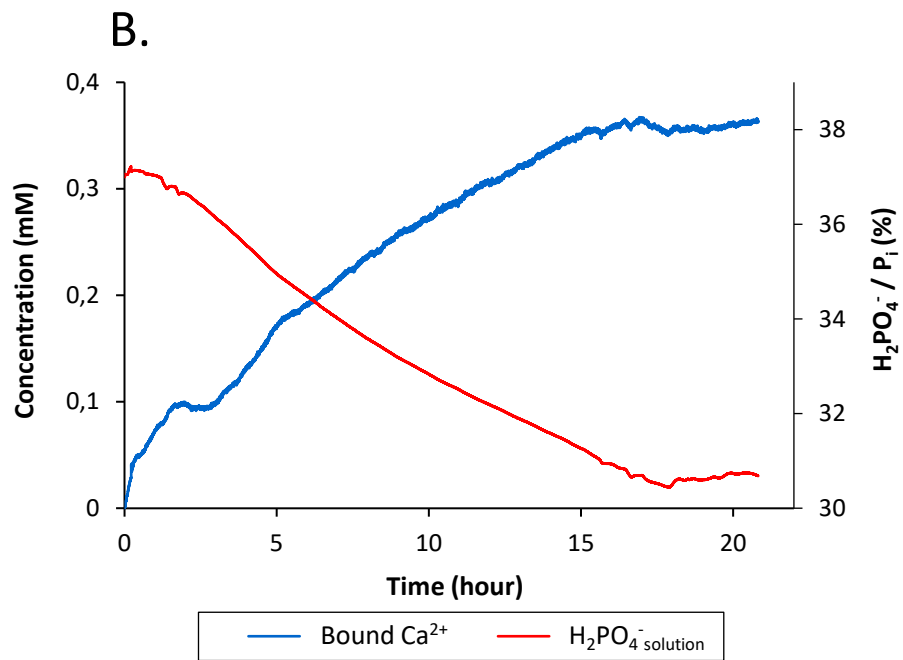


Figure S5. Calculation of bound- Ca^{2+} involved in PNS (blue curve) and H_2PO_4^- concentration (red curve) in mSBF over time.

