



HAL
open science

Effets d'additifs ioniques sur la précipitation de cristaux de pyrophosphate de calcium associés à l'arthrose

Kemie Ley-Ngardigal

► **To cite this version:**

Kemie Ley-Ngardigal. Effets d'additifs ioniques sur la précipitation de cristaux de pyrophosphate de calcium associés à l'arthrose. Matériaux. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2016. Français. NNT : 2016INPT0095 . tel-04259444

HAL Id: tel-04259444

<https://theses.hal.science/tel-04259444>

Submitted on 26 Oct 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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Science et Génie des Matériaux

Présentée et soutenue par :

Mme KEMIE LEY-NGARDIGAL

le jeudi 3 novembre 2016

Titre :

EFFETS D'ADDITIFS IONIQUES SUR LA PRECIPITATION DE
CRISTAUX DE PYROPHOSPHATE DE CALCIUM ASSOCIES A
L'ARTHROSE

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (C.I.R.I.M.A.T.)

Directeur(s) de Thèse :

MME CHRISTELE COMBES

MME BEATRICE BISCANS

Rapporteurs :

M. JAIME GOMEZ MORALES, UNIVERSITE DE GRENADE

M. JEAN-MICHEL BOULER, UNIVERSITE DE NANTES

Membre(s) du jury :

M. STEPHANE VEESLER, UNIVERSITES D'AIX-MARSEILLE ET DE TOULON, Président

M. BERNARD MAZIERES, CHU TOULOUSE, Membre

Mme BEATRICE BISCANS, INP TOULOUSE, Membre

Mme CHRISTELE COMBES, INP TOULOUSE, Membre

Remerciements

Ce manuscrit clôt trois années de travail riches en émotion durant lesquelles j'ai été bien accompagnée. A ce titre je souhaite ici adresser mes remerciements chaleureux aux nombreuses personnes qui ont participé à cette thèse, par leur aide, leur conseil et leur soutien, contribuant ainsi de près ou de loin à son aboutissement.

Mes premiers remerciements s'adressent à mes encadrants, Christèle COMBES, Béatrice BISCANS, Christian REY et Sébastien TEYCHENÉ. Je vous remercie pour avoir partagés vos compétences scientifiques et techniques et pour votre investissement qui a été très enrichissant et indispensable au cheminement et à l'aboutissement de ces travaux. Ce sont toutes vos nombreuses qualités scientifiques et humaines qui sont à l'origine du succès de ce travail, qui est aussi le vôtre. Un très grand merci à tous avec une mention spéciale pour mes directrices et les nombreuses heures de corrections notamment durant les vacances d'été : un investissement de tous les instants qui m'a été très précieux !

Je souhaite aussi exprimer ma gratitude aux membres du jury ayant acceptés de juger cette thèse et d'apporter leur regard pluridisciplinaire sur ce travail.

M. Stéphane VEESLER, Laboratoire CINAM, CNRS, merci de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse et d'apporter ces commentaires et corrections éclairés et pertinents

M. Jean-Michel BOULER, Laboratoire CEISAM - Université de Nantes, merci d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit et permis de l'améliorer par vos remarques éclairées.

M. Jaime Gómez Morales, Laboratorio Estudios Cristalográficos, IACT,CSIC-UGR, merci d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit et ainsi de l'améliorer par vos corrections pertinentes, gracias.

M. Bernard MAZIERES, CHU de Toulouse - Université Paul Sabatier, merci pour votre expertise incontestable des minéralisations pathologiques qui m'a beaucoup apporté. Votre approche et votre point de vue ont permis une mise en perspective globale de ce travail très apprécié.

Cette thèse s'est déroulée au Laboratoire de Génie Chimique et à l'Institut Carnot CIRIMAT de Toulouse et nous avons collaboré avec l'INSERM U1132 BIOSCAR à l'Hôpital Lariboisière (Paris), le Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris et le Laboratoire du Pr KOUTSOUKOS au Department of Chemical Engineering de l'Université de Patras en Grèce. J'ai alors eu l'opportunité de collaborer avec de nombreuses personnes de talent et humainement formidable qui, chacun dans leur domaine ont apporté leurs connaissances, leurs expertises une aide au combien précieuse dans la réalisation de ce travail. Je remercie donc tout particulièrement : Hang-Korng EA, Frédéric LIOTE et Laure CAMPILLO du Centre Viggo Petersen de l'Hôpital Lariboisière, à Paris, pour tous les aspects biologiques et médicaux de cette thèse. Dominique BAZIN, Christian BONHOMME, et Cristina COELHO du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, et Solène REGUE du Synchrotron SOLEIL (ligne DIFFABS) pour leur aide et le savoir qu'ils m'ont transmis lors des campagnes d'analyse RMN et XANES/EXAFS. Je remercie aussi

chaleureusement le Pr. Petros KOUTSOUKOS, Professeur à l'Université de Patras, concernant sa contribution au travail sur la croissance cristalline, *σαξευχαριστώ*.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à Christine BOUTEILLER et Dominique POQUILLON pour leur encadrement et/ou leur aide lors de mon avenant d'enseignement qui fut une formidable aventure professionnelle et humaine. Merci aussi pour votre écoute et vos encouragements pour ma thèse vous être des personnes avec de grandes qualités que j'ai été ravis de rencontrer.

Je tiens également à remercier les formidables équipes techniques et administratives des laboratoires LGC et CIRIMAT pour leur contacts chaleureux, leur gentillesse et leur aide précieuse et inestimable au cours d'une thèse. Cela a toujours été un plaisir de vous côtoyer tout au long de ces trois années.

Merci beaucoup à Jean-Louis NADALIN, Jacky LABADIE, Ignace COGHE, Lacen FARHI, Franck DUNGLAS et Frédéric DACOSTA pour m'avoir fourni d'excellents équipements et toujours répondre présents. Merci à Olivier MARSAN et Cédric CHARVILLAT pour votre aide scientifique précieuse, votre investissement, nos discussions et nos délires. Cédric, j'ai passé un très bon moment au synchrotron, c'était fatigant mais on aura bien rigolé! Merci aussi à Françoise BOSC et Carole THOURON pour leur aide et leur grande gentillesse ainsi qu'à Katia RELIQUET, Caroline JOB et Dominique BONSIRVEN. Merci aux « filles du SAP », Marie Line DE SOLAN, Gwenaëlle RAIMBEAUX et Christine REY- ROUCH pour leur aide et leur gentillesse. Je remercie également le personnel administratif du laboratoire pour leur disponibilité. Un merci particulier à Dany BOUSCARY et Christine TAURINES pour leur aide maternelle. Merci à Claudine LORENZON pour son extrême gentillesse et son aide toujours très efficace. Alain PHILIP, je te remercie pour toute l'attention que tu portes aux doctorants comme un père le ferait. Mille merci pour ta bienveillance, pour les cactus et leur babysitting durant les vacances et pour ta bonne humeur communicative.

Je remercie également les nombreux chercheurs de mes deux laboratoires pour les discussions et les bons moments passés ensemble. Emanuel CID, Jean-Luc TROMPETTE, Kevin ROGER, Olivier MASBERNAT, Christophe DROUET, David GROSSIN, Ghislaine BERTRAND pour les discussions scientifiques ou non, autour d'un café notamment.

Je souhaite aussi remercier mes différents collègues de bureaux Aurélie, Pierre S et Pierre G, Dimitri, Léa et Pedro pour tous les bons moments passés ensemble! Merci également aux doctorants et amis du bureau 1-r1-1 au CIRIMAT véritable réserve de gâteaux et nourriture en tout genre! Merci à Maëla, Camille et Frédérique. Je remercie également tous les autres doctorants/post-docs/et stagiaires avec qui j'ai passé de très bons moments : Sara, Vincent, Nick, Antoine, Léo, Fatine, Omar, Maxime, Martial, Nico, Marion, Alicia, Norinda, Lise, Wini, Laetitia, Manu, Hassan, Pierre-Luc. Un merci tout spéciale pour « mes » stagiaires : Sarah, Léa, Lisa, Sofia et Mélinda, vous avez été top, tant sur le plan professionnel que personnel et merci d'avoir apporté votre contribution à cette thèse. Je souhaite bon courage pour la fin aux doctorants. Et je n'oublie pas tous ceux qui auraient pu se perdre dans ma mémoire mais qui restent dans mon cœur. Ce fut vraiment une chance de travailler dans un tel environnement.

Marina, Léa, Fatma et Adèle mes amies, mes acolytes, une des plus belle rencontre pendant la thèse. Je vous remercie pour tous les moments partagés ensemble, les bons comme le mauvais, votre soutien précieux a été très important. Je remercie infiniment Pierre Gras le fameux Gras et al que je cite constamment dans cette thèse. Merci pour le savoir que tu m'as transmis en tant que collègue, mentor je dirais, pour tes encouragements, ton soutien, nos discussions en tout genre, ton amitié sans faille tout au long de ces trois années et maintenant encore. Cette thèse c'est aussi un peu la tienne : un grand merci pour tout. Brice, ma moitié, un immense merci. Merci d'abord pour ton précieux soutien à tout épreuve 24h/24H et 7j/7j, ta compréhension, merci de m'avoir écouté et supporté alors que toi aussi tu finalises trois ans de thèse. Le meilleur reste encore à venir. Je souhaite aussi remercier ta famille pour leur encouragement et pour m'avoir choyé pendant une partie de ma rédaction, merci de m'avoir accueilli parmi vous si chaleureusement.

Enfin, mes derniers remerciements chargés d'émotion se tournent vers mes parents Anne et Madjidet, mes frères Mota et Kaad et ma sœur Remadji. Vous savez et moi aussi TOUT ce que vous avez fait pour me guider, m'accompagner jusque-là... Vous avez tellement fait, mille MERCI. Mes grands-parents c'est aussi à vous que je dédie tout ça, Louise, Marie-Yvonne, André et Michel, ma famille française et tchadienne. J'espère vous avoir rendu fier.

A mes parents, à ma famille,

I-5-3	Modélisation des équilibres des solutions aqueuses de pyrophosphate de calcium	
I-5-4	Détermination du coefficient d'activité: modèles thermodynamiques	575
I-5-4-1	Modèle de Pitzer	57
I-5-4-2	Modèle Debye-Hückel et extension	59
I-5-5	La nucléation	61
I-5-5-1	La nucléation hétérogène	65
I-5-5-2	La nucléation secondaire vraie	65
I-5-6	La croissance cristalline	66
I-5-6-1	Définition de la vitesse de croissance cristalline	66
I-5-6-2	Les mécanismes de croissance cristalline	66
I-6	Influence d'additifs en précipitation	72
I-6-1	Classification des additifs	73
I-6-2	Mécanismes d'action des additifs	77
I-6-3	Effet d'additifs sur la cristallisation de pyrophosphates de calcium	82
I-7	Conclusion - Positionnement de la thèse	87
CHAPITRE - II ETUDE DE L'INFLUENCE D'ADDITIFS IONIQUES SUR LA PRECIPITATION DE PYROPHOSPHATES DE CALCIUM HYDRATES, EN CONDITIONS CONTROLEES		
		89
II-1	Introduction	91
II-2	Procédé de précipitation de pyrophosphates de calcium hydratés	92
II-2-1	Dispositif expérimental	92
II-2-2	Protocole expérimental	93
II-3	Expériences préliminaires d'exploration des domaines de prédominance des phases	94
II-3-1	Effet du débit et de la vitesse d'agitation sur la formation de pyrophosphates de calcium hydratés	94
II-3-2	Effet du débit et de la vitesse d'agitation sur la formation de pyrophosphates de calcium hydratés à partir d'un précurseur de $K_4P_2O_7$ provenant d'un nouveau lot	99

II-3-3 Effet du pH et de la température sur la formation de pyrophosphates de calcium hydratés à partir d'un précurseur de $K_4P_2O_7$ provenant d'un nouveau lot.....	100
II-4 Influence d'additifs ioniques sur la précipitation de la phase t-CPPD en conditions contrôlées	102
II-4-1 Additif initialement présent dans la solution tampon : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX	102
II-4-2 Additif initialement présent dans l'un des deux réactifs (seringue) : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX.....	107
II-4-3 Discussion sur l'influence du mode d'introduction de l'additif dans le milieu réactionnel	114
II-4-3-1 Analyses élémentaires par ICP-OES	116
II-4-3-2 Analyses par microscopie électronique à balayage	119
II-5 Influence d'additifs ioniques sur la précipitation de la phase m-CPPD en conditions contrôlées	122
II-5-1 Additif initialement présent dans la solution tampon : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX	122
II-5-2 Additif initialement présent dans l'une des deux solutions de réactifs (seringue) : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX	127
II-5-3 Discussion sur l'influence du mode d'introduction de l'additif.....	130
II-5-3-1 Analyses élémentaires complémentaires par ICP-OES	131
II-5-3-2 Analyses complémentaires par microscopie électronique à balayage	134
II-6 Influence d'additifs ioniques sur la précipitation de la phase m-CPPT β en conditions contrôlées	136
II-6-1 Additif initialement présent dans la solution tampon : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX	136
II-6-2 Additif initialement présent dans l'un des deux réactifs (seringue) : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX.....	139
II-6-3 Discussion sur l'influence du mode d'introduction des additifs.....	142
II-6-3-1 Analyses élémentaires complémentaires par ICP-OES	143
II-6-3-2 Analyses complémentaires en microscopie électronique à balayage	146

II-7	Analyses structurales par spectroscopie RMN du solide	148
II-7-1	Cas des poudres synthétisées en présence d'additifs dans les conditions d'obtention de la phase t-CPPD.	149
II-7-1-1	Cas des échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+}	152
II-7-1-2	Cas des échantillons synthétisés en présence de Fe^{3+}	155
II-7-1-3	Cas des échantillons synthétisés en présence de Zn^{2+} ou Mg^{2+}	157
II-7-2	Cas des poudres synthétisées en présence d'additifs dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPD	162
II-7-2-1	Cas des échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+}	164
II-7-2-2	Cas des échantillons synthétisés en présence de Fe^{3+}	166
II-7-2-3	Cas des échantillons synthétisés en présence de Mg^{2+}	167
II-8	Apport de l'étude à la problématique médicale	170
II-9	Conclusion	171
CHAPITRE - III ETUDE DE LA GERMINATION ET DE LA CROISSANCE		
CRISTALLINE DE PYROPHOSPHATES DE CALCIUM HYDRATES		
173		
III-1	Introduction	175
III-2	La méthode de croissance cristalline à composition constante	176
III-2-1	Principe de la méthode	176
III-2-2	Dispositif expérimental	177
III-2-3	Les conditions expérimentales	179
III-2-3-1	La solution de travail	179
III-2-3-2	Les solutions titrantes	179
III-2-3-3	Données de solubilité.....	180
III-2-3-4	Les semences	182
III-2-3-5	Moyens d'interprétation.....	183
III-3	Résultats expérimentaux	183
III-3-1	Détermination des paramètres cinétiques.....	183
III-3-2	Effet de la sursaturation : cas d'une semence de phase t-CPPD	185

III-3-2-1	Influence de la sursaturation relative sur le temps d'induction	190
III-3-2-2	Influence de la sursaturation relative sur la vitesse initiale de croissance...	191
III-3-3	Etude de la cristallisation de la phase m-CPPD et m-CPPT β à partir d'une semence respectivement de la même phase	195
III-3-3-1	Cas de la cristallisation du m-CPPD à la surface d'une semence de m- CPPD	195
III-3-3-2	Cas de la cristallisation du m-CPPT β à la surface d'une semence de m-CPPT β	197
III-3-3-3	Comparaison des résultats obtenus pour les différentes phases de CPP hydraté	199
III-3-4	Effet d'additifs ioniques sur la cristallisation de la phase t-CPPD	199
III-3-5	Caractérisation par microscopie électronique à balayage du t-CPPD formé en présence ou non d'additifs ioniques.....	209
III-3-6	Discussion	212
III-4	Etude préliminaire de la minéralisation de ménisques arthrosiques	214
III-4-1	Etude préliminaire via la méthode de C4	215
III-4-2	Etude dynamique en cellule de diffusion	218
III-4-2-1	Description du dispositif et protocole expérimental	218
III-4-2-2	Résultats expérimentaux et discussion	221
III-5	Conclusion et perspectives	223
	CONCLUSION GENERALE.....	227
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	235
	ANNEXES.....	247
	ANNEXE 1- DESCRIPTION DES DIFFERENTES TECHNIQUES D'ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES UTILISEES.....	249
1 -	Diffraction des rayons X (DRX)	249
2 -	Méthodes Spectroscopiques	249

2-1 - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	249
2-2 - Spectroscopie Raman	250
2-3 - Résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide.....	252
3 - Méthodes par microscopie électronique à balayage (MEB).....	252
4 - Analyses chimiques par spectrométrie d'émission à plasma induit ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry)	253
5 - Autre analyses	253

ANNEXE 2- DESCRIPTION DE LA METHODE PONKCS (PARTIAL OR NO KNOWN CRYSTAL STRUCTURE METHOD) POUR LA QUANTIFICATION DE PHASE AMORPHE PARMIS D'AUTRES PHASES CRISTALLISEES EN DRX..254

ANNEXE 3- DETERMINATION DES CONCENTRATIONS DES SOLUTIONS UTILISEES POUR LA CROISSANCE CRISTALLINE A COMPOSITION CONSTANTE 256

ANNEXE 4- FIGURES COMPLEMENTAIRES260

Introduction générale

L'arthrose est l'arthropathie la plus répandue qui affecte 9 à 10 millions de personnes en France dont 60% de la population âgée de plus de 65 ans provoquant douleur et handicap chez les patients. Les causes de cette maladie sont encore mal comprises et les traitements disponibles à ce jour sont uniquement symptomatiques. L'ultime solution, radicale mais pas inévitable s'avère être la pose d'une prothèse articulaire. Sur environ deux millions de patients atteints d'arthrose 150 000 prothèses de hanches et de genoux sont posées. Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés notamment génétique, mécanique et le vieillissement. Par ailleurs, la présence de microcristaux calciques au niveau des articulations a été identifiée comme un des facteurs aggravants de la maladie. En effet, ce serait la répétition des crises inflammatoires déclenchées par ces calcifications qui favoriserait le développement de l'arthrose au sein de la cavité ostéo-articulaire concernée aboutissant à la dégradation progressive des tissus au sein de l'articulation (dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral,...).

Deux principaux types de microcristaux ont été identifiés dans les liquides articulaires et le cartilage arthrosique : des pyrophosphates de calcium dihydratés ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CPPD mono- et/ou triclinique) et des orthophosphates de calcium (apatite, phosphate octocalcique...). Si les conditions de formation ainsi que la structure et la physico-chimie des orthophosphates de calcium, qui ont des applications biomédicales notamment en tant que matériaux de substitution osseuse, sont relativement bien connues, les conditions de formation des pyrophosphates de calcium ainsi que les paramètres influençant cette formation sont toujours ignorés environ 50 ans après leur première observation. La difficulté à synthétiser des composés de pyrophosphate de calcium dihydraté purs et en quantité importante a limité la progression des connaissances sur les différentes phases impliquées dans la maladie.

Comment les cristaux de pyrophosphates de calcium se forment dans l'articulation ? Leur structure, leurs propriétés physico-chimiques, les mécanismes de leur formation et leur évolution en milieu vivant ou plus simplement en milieu aqueux ont été très peu étudiés et sont encore très mal connus. L'influence de la composition très complexe des milieux articulaires et du cartilage sur les phénomènes de cristallisation reste un champ de recherche peu exploré. Une meilleure connaissance des mécanismes de formation des phases de pyrophosphate de calcium pourrait cependant améliorer la compréhension des raisons de leur apparition dans les articulations arthrosiques, afin de procurer des éléments nécessaires à la mise au point d'un traitement thérapeutique à moyen-long terme permettant soit d'empêcher leur formation soit de dissoudre les cristaux de pyrophosphate de calcium hydraté et/ou de

limiter leur développement. Pour atteindre cet objectif nous avons besoin de contribuer à une meilleure connaissance de la formation de ces phases d'intérêt biologique via l'utilisation d'une méthode de synthèse répétable et reproductible et la caractérisation physico-chimique de ces phases afin d'apporter des éléments aux différentes problématiques soulevées. Cette thèse a bénéficié d'un financement qui s'inscrit dans le cadre d'une collaboration formalisée autour du projet ANR Blanc CAPYROSIS « Formation de cristaux de pyrophosphates de calcium et arthrose : études *in vitro* et *in vivo* » (ANR-12-BS08-0022-01, 2013-2017) coordonné par le CIRIMAT. Ainsi ce projet de thèse inter- et multidisciplinaire a été réalisé en collaboration avec quatre partenaires académiques nationaux et un partenaire académique international qui ont contribué chacun dans leur cœur de compétences :

1 • l'Institut Carnot CIRIMAT UMR 5085 UPS-CNRS-INPT (Toulouse),
Elaboration et caractérisation des différentes phases de pyrophosphates de calcium.

2 • le Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503 UPS-CNRS-INPT (Toulouse) :
Etude des mécanismes de nucléation et de croissance cristalline et solubilité, effets des additifs.

3 • l'INSERM U1132 BIOSCAR à l'Hôpital Lariboisière (Paris) : Chirurgie ostéo-articulaire (spécimens biologiques), études biologiques *in vitro* et *in vivo*.

4 • le Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris UMR 7574 UPMC Sorbonne Universités-CNRS (Paris) : Caractérisation fine (spécimens biologiques et analogues synthétiques) notamment par RMN du solide.

5 • le Laboratoire du Pr Koutsoukos au Department of Chemical Engineering de l'Université de Patras en Grèce. Dans le cadre de son accueil au CIRIMAT pendant 1 mois en 2015, nous avons pu initier des travaux en collaboration sur la croissance cristalline à composition constante de pyrophosphates de calcium hydratés.

Un premier objectif de cette thèse est l'étude et la compréhension des mécanismes de précipitation de quatre variétés de pyrophosphates de calcium (CPP) hydratés présentant un intérêt biologique, en présence ou non d'additifs ioniques d'intérêt médical. Un second objectif consistera à élaborer et mettre en œuvre un système permettant de se rapprocher des conditions de précipitation rencontrées dans le milieu vivant (présence de cartilage/ménisque et d'une solution de composition contrôlée) pour parvenir à étayer et compléter les résultats de l'étude de l'influence d'additifs sur la formation des CPP. Les résultats alors obtenus

devraient permettre de préciser le rôle de certains additifs ioniques naturellement présents dans le corps humain sur les mécanismes de formation des cristaux de CPPD liés à l'arthrose.

Après la présentation de quelques notions générales et une revue bibliographique présentées dans le premier chapitre afin de situer la problématique liée aux cristaux de pyrophosphate de calcium et leur rôle dans l'arthrose, nous aborderons dans un deuxième chapitre la mise au point d'un protocole de synthèse des différentes phases de pyrophosphate de calcium hydraté en présence ou non d'additifs ioniques d'intérêt biologique. Les caractérisations structurales, spectroscopiques, chimiques et morphologiques des différentes phases ainsi obtenues nous permettront de conclure sur l'influence des additifs étudiés. Le troisième chapitre exposera dans un premier temps l'étude de la croissance cristalline à composition constante des phases observées *in-vivo* en présence ou non d'additifs ioniques. Dans un second temps, nous présenterons l'étude préliminaire réalisée à partir d'un système de diffusion élaboré pour étudier la formation de CPP en présence de spécimens biologiques (ménisques) fournis par médecins partenaires de ce projet.

Chapitre - I Eléments bibliographiques

I-1 Introduction

Cette revue bibliographique a pour but de positionner le sujet de thèse et de présenter les principales notions de base nécessaires à la réalisation de cette thèse. Dans un premier temps, des généralités sur les biominéralisations normales et pathologiques, puis les données connues sur les pyrophosphates de calcium en lien avec l'aspect médical ainsi que les travaux antérieurs réalisés sur la synthèse des pyrophosphates de calcium seront présentés. Dans un second temps, un état de l'art sur les étapes d'une réaction de précipitation en milieu synthétique simplifié (mélange, réaction, germination, croissance, agrégation) sera décrits. Ensuite, l'influence d'additifs connus sur les cinétiques de précipitation ainsi que le choix des additifs ioniques d'intérêt pour ces travaux de thèse seront abordés. Et enfin, nous terminerons ce chapitre en positionnant ce travail de thèse par rapport à l'état de l'art.

I-2 Généralités sur les calcifications pathologiques

Une calcification pathologique (Bonucci, 2007), (Königsberger and Königsberger, 2006) est d'un point de vue médical définie comme étant constituée de dépôts minéraux anormaux, pouvant être calciques, au sein des organes ou des tissus. Les calcifications peuvent être classées en trois familles de biominéraux : concrétions¹, calcifications métastatiques² et calcifications dystrophiques³. Par exemple, les calculs rénaux (Coe et al., 2005), (Williams Jr, 2009) sont des concrétions solides de minéraux dissouts dans l'urine présente dans les reins. En revanche, les calcifications métastatiques et dystrophiques, qui peuvent être considérés comme des calcifications ectopiques (Cotran et al., 1994), sont définies comme des biominéralisations inattendues (Lowenstam and Weiner, 1989),(Mann, 1996), survenant dans les tissus mous (Anghileri, 1992). En l'absence d'un déséquilibre systémique minéral, la calcification dystrophique est souvent associée à une altération des tissus ou à une nécrose tissulaire (Giachelli, 1999). En revanche, les calcifications métastatiques résultant d'un déséquilibre minéral sont plus systémiques et touchent divers

¹ Masse pierreuse, solide, organisée ou non, qui se forme dans l'épaisseur des tissus, dans les articulations, dans les conduits et réservoirs et pouvant survenir au cours d'un processus pathologique.

² Formation de dépôts calcaires parfois volumineux au niveau de certains tissus et de certains organes, notamment les vaisseaux sanguins, le tissu alvéolaire pulmonaire et le parenchyme rénal, dans les cas d'hypercalcémie.

³ Dépôt calcique intra ou extra cellulaire se faisant à la faveur de lésions cellulaires ou tissulaires: foyers de nécrose d'origine inflammatoire ou circulatoire, athérosclérose, nécrose tumorale, etc., sans hypercalcémie.

tissus (les vaisseaux, les poumons et les reins par exemple). Une quatrième famille pourrait être considérée comme une calcification physiologique (os), qui devient pathologique lorsque le patient souffre de maladies telles que l'ostéoporose ou l'ostéogenèse imparfaite (*Osteogenesis Imperfecta*).

La formation de minéraux en milieu biologique (biominéralisation) que ce soit dans des fluides biologiques, à la surface ou au sein de tissus mous est un sujet particulièrement interdisciplinaire (De Ricqlès and Jacques Livage, 2004). Les biominéralisations couvrent toute la gamme des questions consacrées à l'étude des minéraux produits par des organismes vivants (Boskey, 2003). Lowenstam (Lowenstam, 1981), (Lowenstam, 1986) a défini deux modes de biominéralisations: les biominéralisations biologiquement induites et les biologiquement contrôlées (Baeuerlein, 2000), (Weiner and Dove, 2003).

L'étude de calcifications pathologiques est liée à certains aspects physico-chimiques fondamentaux (Bazin et al., 2012) telles que la solubilité des phases minérales, la germination et la croissance cristalline et/ou des processus d'agrégation et de phénomènes interfaciaux (adsorption de surface et les réactions sur la base de l'interaction entre les minéraux et les protéines ou les ions en tant que promoteurs ou inhibiteurs de cristallisation, etc.). Il est connu que des composés organiques (protéines dont collagène, phosphoprotéines...) sont responsables de l'orientation et de la croissance contrôlée des cristaux de phosphate de calcium (CaP) notamment lors de la minéralisation osseuse normale ou pathologique. Ce contrôle moléculaire peut toucher la taille, la morphologie, l'orientation cristallographique et l'agrégation des cristaux.

Différents types de cristaux calciques (phosphates de calcium, oxalates de calcium, carbonates de calcium,...) sont rencontrés dans les calcifications pathologiques. Une liste non exhaustive de la plupart d'entre elles est présentée dans le Tableau I-1.

Tableau I-1- liste non exhaustive des différents types de cristaux calciques (phosphates de calcium, oxalates de calcium, carbonates de calcium, ...) rencontrés dans les calcifications pathologiques.

Phase chimique identifiée	Localisation
Pyrophosphate de Ca	Cartilage, ménisque, liquide synovial, membrane synoviale
Apatite de calcium carbonatée (CA) $\text{Ca}_{10-x+u} \text{M}_{x-u} (\text{PO}_4)_{6-x} (\text{CO}_3)_x (\text{OH})_{2-x+2u}$ avec M lacunes, $x \leq 2$ et $u \leq x/2$	Rein, sein, thyroïde, cartilage, vessie, prostate, glandes salivaires, appareil circulatoire (veines, artères, cœur), peau, muscle, placenta
Whitlockite ($\text{Ca}_9\text{MgH} (\text{PO}_4)_7$)	Rein, cartilage, poumons, système cardiovasculaire, prostate, disques intervertébraux, glandes salivaires, intestin
Oxalate de calcium monohydraté (COM) $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Rein, prostate, rétine, os, vaisseaux
Oxalate de calcium dihydraté (COD) $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Rein, sein, thyroïde, prostate
Oxalate de calcium trihydraté (COT) $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Rein
Polymorphes du carbonate de calcium (calcite, aragonite, vaterite) CaCO_3	Pancréas, foie, vésicule et voies biliaires, rein (calcite)
Palmitate de calcium, stéarate de calcium	Vésicule biliaire, intestin

Les CaP apatitiques qui sont rencontrés dans une large gamme de calcifications pathologiques peuvent présenter des substitutions avec une large gamme de types et de teneurs d'ions qui peuvent modifier leurs propriétés biologiques et physico-chimiques. Les possibilités les plus intéressantes sont observées avec les apatites nanocristallines, qui peuvent être trouvées dans de nombreuses calcifications normales et pathologiques, notamment l'arthrose et la chondrocalcinose dont il est question dans cette étude. La capacité des apatites biologiques et synthétiques à évoluer et à s'adapter à leur environnement est liée à leur faible cristallinité et à l'étendue de la couche de surface hydratée contenant des espèces labiles non apatitiques (Li et al., 2007), (Cazalbou et al., 2004). En effet, ces composés sont caractérisés par l'existence d'une couche hydratée d'ions minéraux faiblement liés (ions labiles) à la

surface des cristaux, qui peuvent être facilement échangés avec des ions ou des molécules du milieu environnant.

Nous nous intéresserons lors cette étude aux calcifications pathologiques qui impliquent des ortho- et/ou pyrophosphates de calcium en lien avec des maladies ostéo-articulaires.

I-3 Généralités sur les maladies ostéoarticulaires à cristaux

Il existe de nombreuses maladies ostéo-articulaires pour lesquelles la formation de micro-calcifications pathologiques est constatée. Les rhumatismes microcristallins tels que la chondrocalcinose (la pseudogoutte), la goutte, la tendinopathie calcifiante et l'arthrose en font partie ainsi que les cas d'hypercalcémie, c'est-à-dire de présence excessive de calcium dans le sang causant la calcification de certains organes. Les organes parmi les plus souvent touchés sont : les reins (risques de formation de calculs rénaux) et les vaisseaux sanguins.

Les calcifications pathologiques concernent essentiellement les tissus mous (tendons, cartilages, ménisques...). Les rhumatismes microcristallins sont caractérisés par des dépôts de microcristaux péri-articulaires ou intra-articulaires. Ces dépôts parfois asymptomatiques sont souvent à l'origine d'accès inflammatoires aigus ou d'arthropathies chroniques.

Les trois types de microcristaux suivants sont en cause :

- cristaux d'urate de sodium (UMS), responsables de la goutte ;
- cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté (CPPD) pour la chondrocalcinose (anciennement appelé pseudogoutte) et l'arthrose;
- cristaux de phosphates de calcium (principalement l'apatite) pour l'arthrose et des dépôts généralement péri-articulaires.

Dans le cadre de cette thèse nous développerons plus particulièrement les cas de la chondrocalcinose et de l'arthrose qui impliquent des cristaux de (pyro)phosphate de calcium.

I-3-1 La chondrocalcinose

Les premières descriptions de la chondrocalcinose, anciennement appelée pseudogoutte en raison de ses manifestations ressemblant souvent à cette dernière, remontent aux années

1960 (Žitňan and Sit' Aj, 1963) et sont caractérisées par des dépôts dans les tissus articulaires hyalins et les fibrocartilages de cristaux de CPPD. La prévalence de la chondrocalcinose augmente avec l'âge : Après 60 ans, la fréquence de la chondrocalcinose idiopathique peut être estimée à environ 1 à 2 % chez les sujets de 60 à 70 ans, 6 à 8 % entre 70 et 80 ans et 20 à 30 % après 80 ans ; elle dépasse 30 % après 90 ans (Richette and Bardin, 2011). Il existe une prédominance féminine pour cette maladie qui diminue avec l'âge. C'est une maladie, asymptomatique dans 25% des cas qui peut se manifester sous forme chronique ou sous forme de crise. Dans 50% des cas la chondrocalcinose peut être associée à l'arthrose avec présence de cristaux de pyrophosphate de calcium ; elle est alors qualifiée de forme pseudo-arthrosique. Dans 90 % des cas la chondrocalcinose est dite idiopathique (de cause inconnue). Elle peut être secondaire à l'hyperparathyroïdie ou à l'hémochromatose. Divers déséquilibres du métabolisme phospho-calcique pourraient favoriser la survenue de cette maladie : hypomagnésémie, hypophosphatémie, hyperparathyroïdie (Jones et al., 1992), (Glass and Grahame, 1976). Dans certains cas, il existe même une composante génétique due à la mutation des gènes *CCAL2* (Williams et al., 2003) ou *TNFRSF11B* (Ramos et al., 2015).

Les traitements de la chondrocalcinose sont symptomatiques. Il s'agit de prises de corticoïdes par voie systémique ou injection intra-articulaire, ou d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). En dernier recours, l'hydroxychloroquine ou le méthotrexate sont indiqués comme pouvant apporter un soulagement (Emkey and Reginato, 2009). Aucun traitement permettant d'empêcher et/ou d'endiguer la maladie n'existe. Comme pour le cas de l'arthrose abordé au paragraphe suivant la présence de cristaux calciques dans l'articulation et les calcifications du cartilage présentent une piste de recherche intéressante afin d'identifier et comprendre les causes ainsi que les mécanismes contribuant à favoriser le développement de la maladie et ses conséquences.

I-3-2 L'arthrose

L'arthrose est la forme la plus fréquente de maladie rhumatismale, affectant des millions de personnes et jusqu'à 80% de la population au-delà de 75 ans (Fuerst et al., 2009). Toutes les articulations des malades atteints d'arthrose sont touchées. Il s'agit principalement du genou ainsi que toutes les composantes de l'articulation : os, cartilage, ménisques et membrane synoviale. Cette maladie particulièrement handicapante entraîne plus de 400 000 hospitalisations par an aux Etats-Unis coutant près de 8 milliards de dollars et une pose de prothèse toutes les 1,5 minutes en Europe (Tableau I-2) ; ces chiffres augmentant d'années en

années (Lynch et al., 2009). En France, les statistiques épidémiologiques, faites en population générale sur la prévalence de l'arthrose symptomatique (la plus intéressante d'un point de vue clinique) des hanches et des genoux (les deux articulations les plus touchées) rapportée à la population française, correspond à environ 2 millions de patients (Tableau I-3). Au-delà de la gêne physique (articulaire) ressentie par 80% des patients arthrosiques cette maladie peut aussi handicaper la vie sociale de ces derniers puisque 25% ne peuvent plus effectuer correctement les gestes du quotidien, ce qui risque alors d'entraîner un isolement.

Tableau I-2 : Nombre (en million) de cas d'arthrose diagnostiqués (Decision Resources Inc., 2014)

Pays ou continents	2002	2007	2012
USA	13,2	14,4	15,5
Europe	14,5	15,2	15,8
Japon	6,6	6,9	7,2
Total	34,3	36,5	38,6

Tableau I-3 Prévalence de la gonarthrose et de la coxarthrose symptomatique en France, en population générale (cohorte nationale KHOALA : Knee and Hip Osteo-Arthritis Long-term Assessment)(Guillemin et al., 2011).

	Coxarthrose	Gonarthrose
Femmes	2,5 %	6,6 %
Hommes	1,9 %	4,7 %

De multiples facteurs aggravants et diverses origines ont été identifiés pour l'arthrose : hérédité, vieillissement, traumatismes et microtraumatismes répétés, surcharge mécanique et pondérale, diabète syndrome métabolique (MacMullan et al., 2011). L'OMS (American Academy of Orthopædic Surgeons Symposium, 1994) indique que : « L'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale (...) conduisant à une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral avec prolifération d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. L'atteinte synoviale est secondaire » (Kuettner and Goldberg, 1994).

Deux principaux types de microcristaux ont été identifiés dans le cartilage arthrosique et les liquides articulaires : les orthophosphates de calcium (CaP comprenant les cristaux de

phosphate octocalcique, et d'apatite carbonatée) et les pyrophosphates de calcium (CPP) (MacMullan et al., 2011).

Deux formes de CPP ont été identifiées *in vivo* en 1961 par McCarty (McCarty et al., 1962), (Kohn et al., 1962) alors que ces cristaux étaient observés dans le fluide synovial de patients atteints d'arthrite goutteuse : les pyrophosphates de calcium dihydratés monoclinique (m-CPPD) et triclinique (t-CPPD). Une grande diversité de taille de cristaux a été observée : de 0,06 à 0,3 μm dans l'articulation temporo-mandibulaire et de 1 jusqu'à 20 μm dans le genou (Kohn et al., 1962) ; (Dijkgraaf et al., 1995). Aucune phase amorphe de CPP n'a pour le moment été identifiée (Pritzker, 1998). Les différentes formes d'orthophosphate et de pyrophosphate de calcium ont été identifiées dans les articulations avec des fréquences différentes : les orthophosphates de calcium identifiés dans plus de 90 % des cas, contre 20% pour les pyrophosphates de calcium. Les deux types de calcification peuvent coexister (Fuerst et al., 2009). Les différentes formes d'orthophosphate et pyrophosphate de calcium identifiées *in vivo* sont les suivantes :

Phosphates de calcium

Apatite non stoechiométrique : $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$

Phosphate octocalcique (OCP) : $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Whitlockite : $(\text{Ca},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$

Amorphe : $\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$

Pyrophosphate de calcium :

Dihydraté (CPPD) : $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Le potentiel inflammatoire de ces différents cristaux a été évalué *in vivo* cependant leur rôle dans la destruction du cartilage ainsi que le développement et l'aggravation de la maladie est encore mal compris et donc discuté (Roch-Arveiller et al., 1990) ; (Swan et al., 1995) ; (Liu et al., 2009). La libération d'interleukine-1 β (IL-1 β) par les macrophages, un marqueur spécifique de l'inflammation, est intrinsèque aux propriétés inflammatoires des CPPD. C'est en déterminant l'évolution de tels marqueurs que Campillo-Gimenez *et al.* (Campillo-Gimenez et al., 2016) ont établi à l'aide d'un modèle *in vivo* en poche à air chez la souris, que la phase

m-CPPD est la plus phlogogène des phases de CPP, suivie de la phase t-CPPD, puis de la phase m-CPPT β et enfin de la phase a-CPP, cette dernière n'étant pas phlogogène du tout.

Ainsi, on note en présence de ces cristaux de CPPD, une réaction inflammatoire et une destruction du cartilage qu'aucun traitement n'est capable de stopper ni d'inverser à ce jour. Les traitements actuels de l'arthrose sont symptomatiques ; ils agissent principalement sur la réduction des symptômes, en particulier la douleur, pour une efficacité modérée, la cause de la maladie restant non élucidée. La compréhension partielle des mécanismes à l'origine de l'arthrose limite le développement de nouveaux traitements. Les différentes stratégies (Zhang et al., 2011) de prise en charge de la maladie selon son stade de développement sont décrites dans le Tableau I-4 ; l'étape ultime, souvent inévitable, est la pose d'une prothèse articulaire.

Tableau I-4 Stratégies de traitement de l'arthrose à différents stades de la maladie (Zhang et al., 2011).

Stratégies	Eventuelles complications - Remarques
Perte de poids et exercice	
Paracétamol	Faible effet analgésique
Inhibiteurs COX2	Complication gastro-intestinales
Anti-inflammatoires non stéroïdiens	Complication gastro-intestinales
Injections d'acide hyaluronique	Faible effet analgésique / Efficacité non prouvée
Injection intra-articulaire de stéroïde	Progression de la maladie
Remplacement de l'articulation par une prothèse	

Alors que la présence de micro-calcifications dans l'articulation est décrite depuis plus de 50 ans, leur impact sur l'évolution de la maladie restent donc à préciser et les connaissances sur ce point nécessitent d'être approfondies tant sur le plan médical que physico-chimique (McCartyJR. et al., 1966). La présence de cristaux calciques au sein la cavité articulaire présente une piste de recherche intéressante pouvant expliquer les causes de l'arthrose et/ou les divers mécanismes favorisant l'aggravation de la maladie. Nous allons maintenant faire un état de l'art et des connaissances relatives aux différentes phases de pyrophosphate de calcium.

I-4 Les pyrophosphates de calcium

I-4-1 Généralités sur les pyrophosphates de calcium

Nous avons vu que parmi les microcristaux associés à l'arthrose, on peut rencontrer deux familles de cristaux ioniques : les orthophosphates et les pyrophosphates de calcium. Les entités orthophosphates (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-), de symétrie tétraédrique, se distinguent de l'entité pyrophosphate ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) qui est caractérisée par la présence d'une liaison P-O-P, résultant de la condensation de deux entités orthophosphate (Figure I-1). La présence de cette liaison P-O-P, spécifique aux pyrophosphates, peut être identifiée notamment par analyse en spectroscopie FTIR.

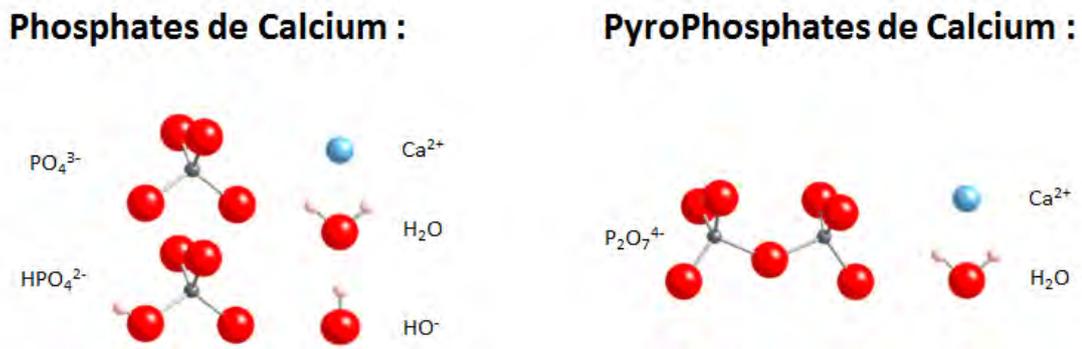


Figure I-1 Représentation schématique des entités ioniques constituant les différentes phases de phosphate et de pyrophosphate de calcium.

Outre les variétés dihydratées de CPP, on distingue d'autres variétés de pyrophosphate de calcium hydratés, tétrahydraté ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et amorphe ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), ainsi que les pyrophosphates de calcium anhydres (α , β et γ), ayant une importance en particulier dans le domaine des biomatériaux (Naga et al., 2014), (Grover et al., 2013), (Lee et al., 2011) et (Koo et al., 2006). Ces dernières phases anhydres étant obtenues à température élevée on ne s'y intéressera pas d'avantage pour la suite de ce chapitre et ni au cours de ces travaux de thèse. Notre intérêt se portera donc sur les phases hydratées qui peuvent se former *in vivo*.

Deux variétés polymorphes de CPPD ont été identifiées *in vivo* : la forme triclinique dihydratée (t-CPPD) (Mandel, 1975) et la forme monoclinique dihydratée (m-CPPD) (Mandel et al., 1988). Ces deux phases seront donc étudiées dans ce travail de thèse ainsi que les formes monoclinique tétrahydratée (m-CPPT β) et amorphe (a-CPP). En effet, des transformations de phases de CPP (Figure I-2) observées *in vitro* pourraient potentiellement

avoir lieu *in vivo*. Les phases m-CPPT β et α -CPP seraient les précurseurs *in vitro* des phases m-CPPD et t-CPPD observées *in vivo* (Brown et al., 1963), (McCartyJR. et al., 1966). Ainsi, la Figure I-2 représente le chemin des transformations possibles des CPP *in vivo* proposé par Gras (Gras, 2014) pouvant aboutir *in fine* selon les conditions locales à un orthophosphate de calcium, la brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Aujourd'hui le mécanisme de formation des CPPD *in vivo* reste indéterminé.

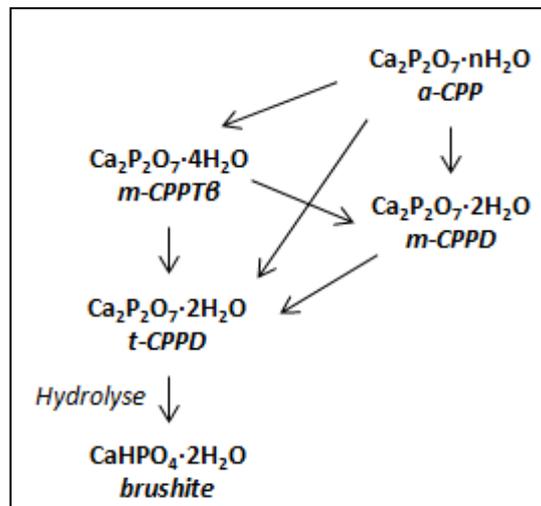


Figure I-2 Représentation schématique des évolutions possibles des différentes phases de CPP *in vivo* (Gras 2014)

Nous allons dans les parties suivantes faire un état de l'art sur l'ensemble des données physico-chimiques, structurales et morphologiques relatives aux quatre phases de CPP hydraté d'intérêt d'un point de vue biologique : m-CPPD, t-CPPD, m-CPPT β et α -CPP. L'ensemble de ces composés sont caractérisés par un même rapport atomique Ca/P = 1 et diffèrent par leur nombre de molécules d'eau de constitution, leur structure, la morphologie, le faciès de leurs cristaux/particules ainsi que par leurs propriétés physico-chimiques. Une partie des avancées les plus récentes sur ces différentes phases est reportée dans la thèse de Pierre Gras (Gras, 2014). Il s'agit notamment des structures des phases m-CPPT β et t-CPPD qui ont été affinées à partir de données de diffraction de rayons X (Gras 2014) et la structure du m-CPPD qui a été déterminée grâce à un affinement de Rietveld des paramètres de maille à partir de données de diffraction de rayons X synchrotron et de diffraction des neutrons (Gras et al., 2016b). Les paramètres de maille des CPP sont des données nécessaires pour la

réalisation des études semi-quantitatives des phases de CPP au sein de chaque échantillon synthétisé qui seront réalisées au chapitre II à l'aide du logiciel TOPAS selon la méthode de (Scarlett and Madsen, 2006) et (Madsen et al., 2011) décrite en annexe 2. Pour chaque phase de CPP les paramètres de maille pris en compte seront ceux déterminés par Gras (Gras, 2014).

I-4-2 Pyrophosphates de calcium triclinique dihydratés triclinique (t-CPPD)

Le pyrophosphate de calcium dihydraté triclinique, t-CPPD ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) cristallise dans une structure de type triclinique. Ses paramètres de maille sont reportés dans le Tableau I-5. La structure de la phase t-CPPD résolue par Mandel (Mandel, 1975) est représentée sur la (Figure I-4). Gras (Gras, 2014) a observé que les molécules de pyrophosphates sont organisées sur les plans (110) avec une alternance dans l'orientation de ces molécules par rapport à l'axe \vec{c} due au centre d'inversion (Figure I-4). La cohésion du cristal suivant l'axe \vec{b} semble assurée par une alternance de liaisons de coordination et de liaisons hydrogène.

Les cristaux de la phase t-CPPD synthétisés et analysés par Gras *et al.* (Gras, 2014) ont des faciès aciculaires avec une forte hétérogénéité de distribution de taille. Comme précédemment observé dans la littérature (Brown et al., 1963) (Mandel et al., 1988) le cristal de t-CPPD (Figure I-3) semble plus large et plus épais que celui de m-CPPD (Figure I-7). Les faces aux extrémités des cristaux (001) de t-CPPD forment d'après Gras (Gras, 2014) des angles de 45 ou 90° avec les face (100) et (010) les plus développées.

Le diffractogramme RX et le spectre FTIR de la phase t-CPPD sont présentés sur les Figure I-5 et Figure I-6. Les pics du diffractogramme RX indexés avec les données de référence de la fiche JCPDS n°00-041-0488 ainsi que l'attribution des bandes de vibration du spectre FTIR sont celles d'une phase t-CPPD parfaitement pure. Le diffractogramme RX et le spectre FTIR de ce t-CPPD synthétisé par nos soins selon la méthode de Gras *et al.* (Gras et al., 2013a) nous serviront de référence tout au long de cette étude.

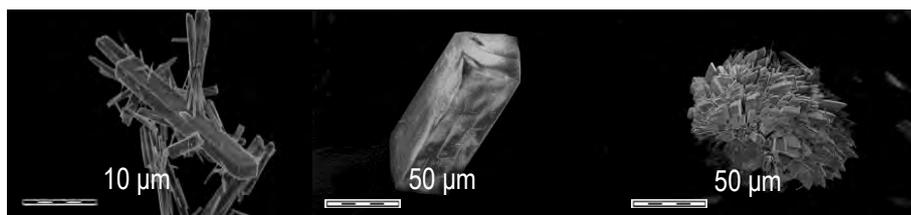


Figure I-3- Images en microscopie électronique à balayage de la phase t-CPPD (Gras, 2014).

Tableau I-5- Paramètres de maille obtenus par Gras (Gras, 2014) et Mandel (Mandel, 1975) pour la phase t-CPPD. Les écarts-types estimés sont indiqués entre parenthèse.

Références	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
(Gras, 2014)	7,359(5)	8,279(6)	6.690(5)	102,87(1)	72,73(1)	94.96(1)
(Mandel, 1975)	7,365(4)	8,287(4)	6,691(4)	102,96(1)	72,73(1)	95,01(1)

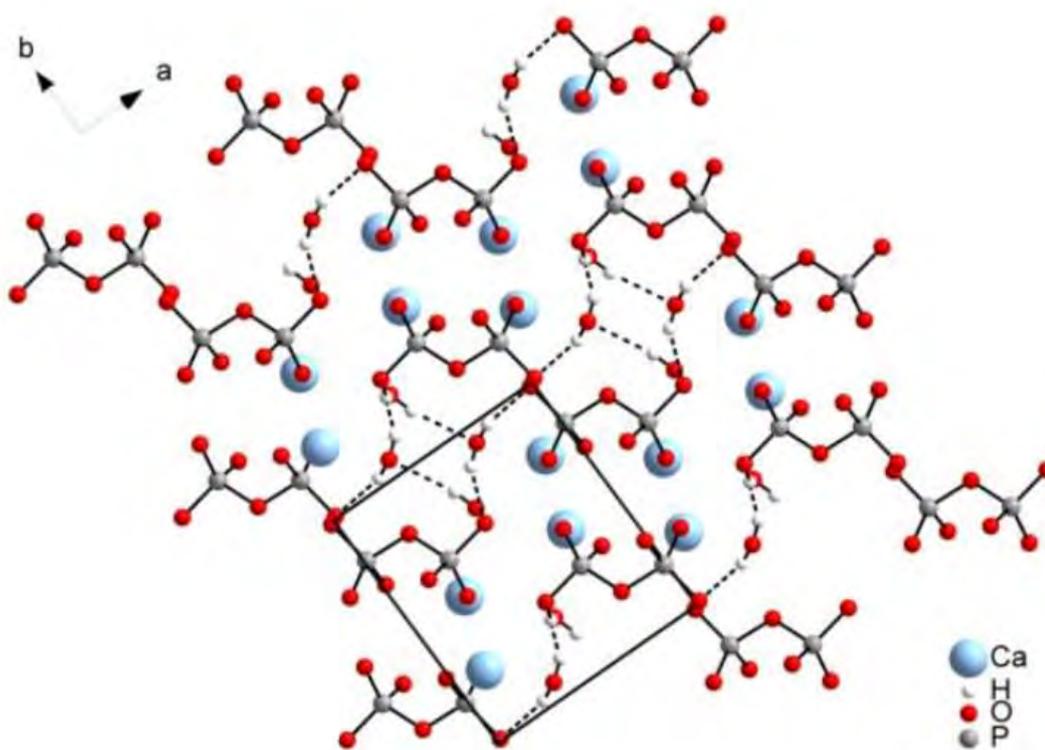


Figure I-4- Structure de la phase t-CPPD suivant l'axe [001] avec représentation des molécules de pyrophosphate organisées suivant le plan (110) et les liaisons hydrogène, en pointillé (Gras, 2014).

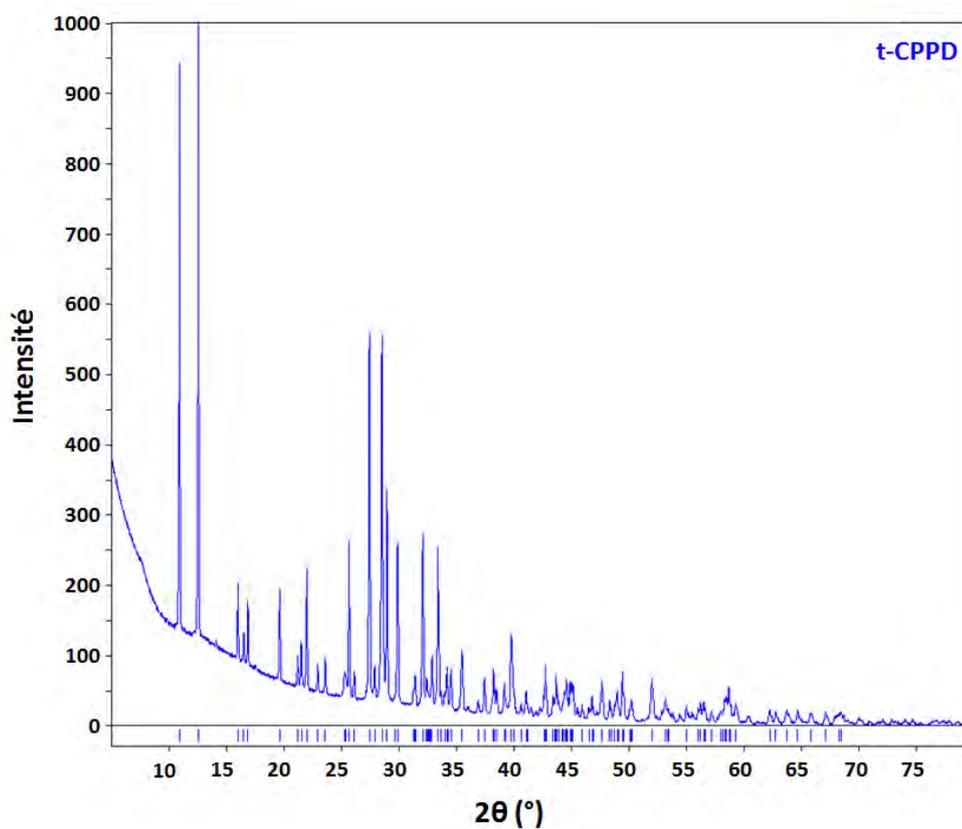


Figure I-5- Diagramme de diffraction des rayons X de phase t-CPPD indexé avec les données de référence de données de référence de la fiche JCPDS n°00-041-0488.

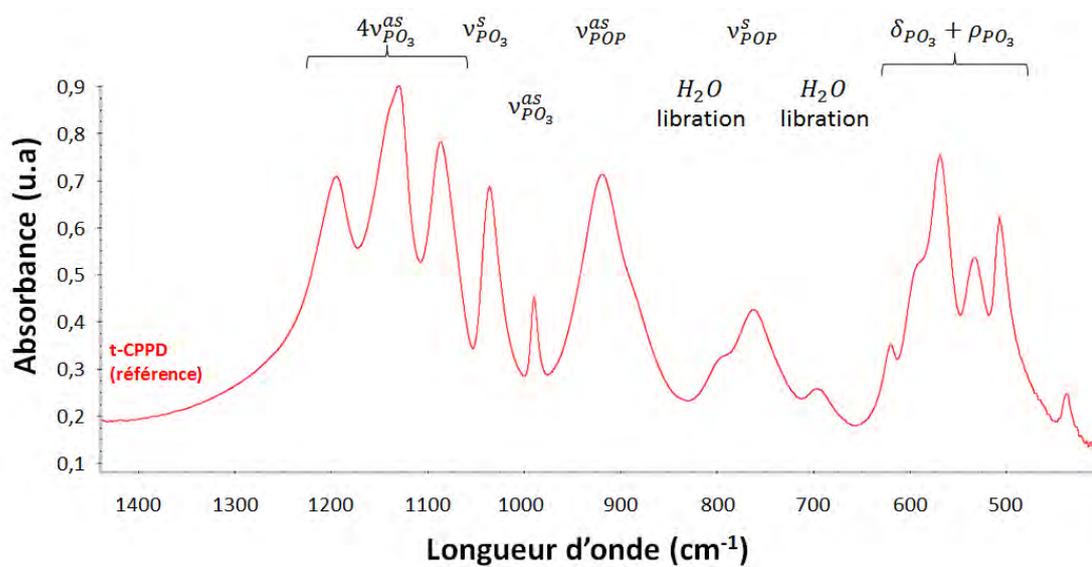


Figure I-6- Spectre FTIR de la phase t-CPPD sur domaines 400-1400 cm^{-1} .

I-4-3 Pyrophosphates de calcium monoclinique dihydratés monoclinique (m-CPPD)

Le pyrophosphate de calcium dihydraté monoclinique m-CPPD possède la même formule chimique que celle de son polymorphe (la phase t-CPPD) : $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

La phase m-CPPD cristallise dans une structure de type monoclinique. Ses paramètres de maille sont reportés dans le Tableau I-6. La structure de la phase m-CPPD résolue par Gras (Gras, 2014) est représentée sur la Figure I-8. Les molécules de pyrophosphate sont organisées sur les plans (010) avec une alternance dans l'orientation de ces molécules par rapport à l'axe \vec{c} due au centre d'inversion. La cohésion du cristal suivant l'axe \vec{b} semble assurée par une alternance de liaisons de coordination et de liaisons hydrogène. C'est une organisation qui est proche de celle observée dans le cas de la structure de la phase t-CPPD résolue par Mandel (Mandel, 1975).

Les cristaux de m-CPPD (Figure I-7) ont une forme assimilable à de fines aiguilles qui forment elles-mêmes des agrégats de forme assimilable à des fagots larges aux extrémités et resserrés au centre, pouvant être reliés à des mécanismes de croissance en sphérulites de catégorie 2 décrite par Gránásy *et al.* (Gránásy *et al.*, 2005).

Le diffractogramme RX et le spectre FTIR de la phase m-CPPD sont respectivement présentés sur les Figure I-9 et Figure I-10. Les pics du diffractogramme RX indexés avec les données de référence disponibles sur la Crystallography Open Database (COD) (Gras *et al.*, 2016b) ainsi que l'attribution des bandes de vibration du spectre FTIR sont bien celles d'une phase de m-CPPD pure. Le diffractogramme RX et le spectre FTIR du m-CPPD synthétisé par nos soins selon la méthode de Gras *et al.* (Gras *et al.*, 2013a) serviront de référence par la suite.

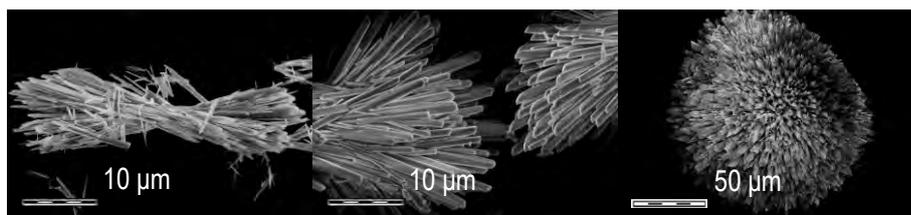


Figure I-7- Images en microscopie électronique à balayage de la phase m-CPPD (Gras, 2014).

Tableau I-6- Paramètres de maille obtenus par Gras (Gras et al., 2016b) pour la phase m-CPPD. Les écarts-types estimés sont indiqués entre parenthèse.

Référence	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
(Gras, 2014)	12,618(1)	9,250(1)	6,760(1)	90,00	104,97(1)	90,00

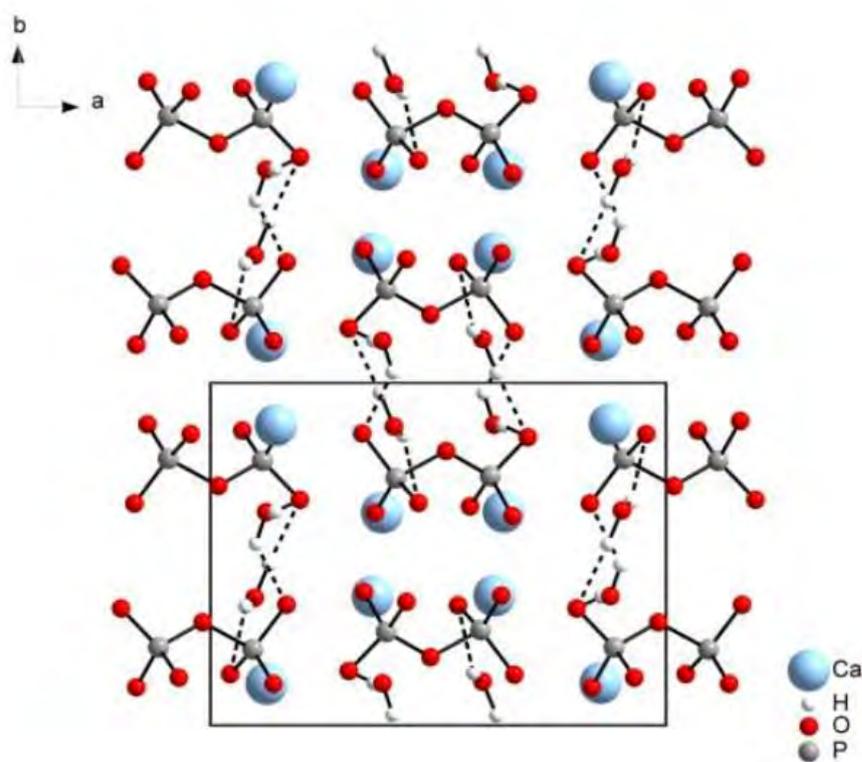


Figure I-8- Structure de la phase m-CPPD suivant l'axe [001] avec représentation des molécules de pyrophosphate organisées sur le plan (010) et les liaisons hydrogène, en pointillé (Gras, 2014).

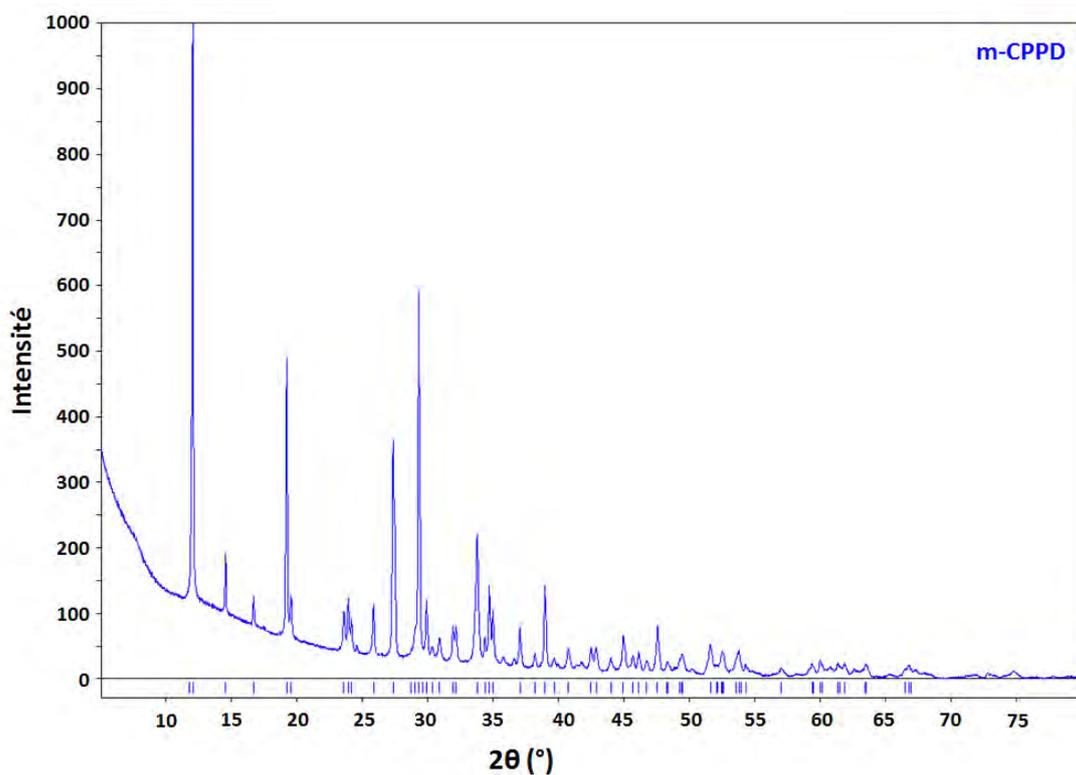


Figure I-9- Diagramme de diffraction des rayons X de phase t-CPPD indexé avec les données de référence de données de référence disponible sur la Crystallography Open Database (COD) (Gras et al., 2016b).

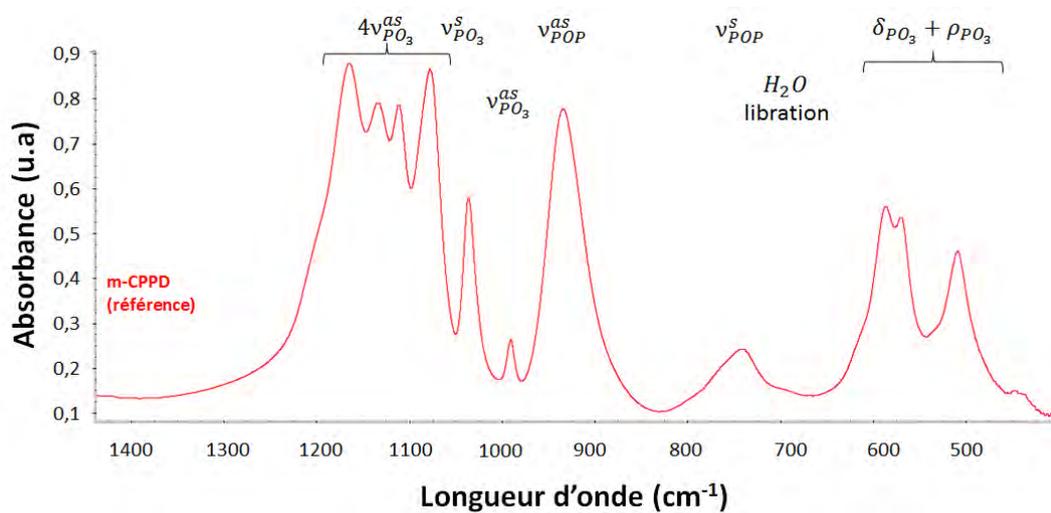


Figure I-10- Spectre FTIR de la phase m-CPPD sur domaines 400-1400 cm^{-1} .

I-4-4 Pyrophosphate de calcium monoclinique tétrahydraté beta monoclinique (m-CPPT β)

Le pyrophosphate de calcium tétrahydraté beta monoclinique (m-CPPT β) possède 4 molécules d'eau de constitution. Sa formule chimique est : $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

La phase m-CPPT β cristallise dans une structure de type monoclinique. Les paramètres de maille sont reportés dans le Tableau I-7. La structure de la phase m-CPPT β représentée sur la Figure I-12 a été résolue par diffraction des rayons X sur monocristal par Balić-Žunić *et al.* (Balić-Žunić *et al.*, 2000). La qualité des cristaux disponibles ne permettant cependant pas le positionnement des atomes d'hydrogène, cette structure a été ensuite affinée par Gras (Gras, 2014). C'est une structure organisée en couches suivant l'axe [100], avec une alternance des couches contenant les molécules de pyrophosphate et les ions calcium et des couches composées de molécules d'eau liées entre elles par liaisons hydrogène. Les couches contenant les molécules de pyrophosphate et les ions calcium peuvent elles-mêmes être décrites comme une alternance suivant l'axe [001] de molécules de pyrophosphate et d'ions calcium (Figure I-12).

Les cristaux de la phase m-CPPT β présentent un faciès en plaquette sous forme de lamelles hexagonales (Figure I-11). Gras (Gras, 2014) a déterminé que ces lamelles ont un grand axe de 20 μm en moyenne.

Le diffractogramme RX et le spectre FTIR de la phase m-CPPT β sont présentés sur les Figure I-13 et Figure I-14. Les pics du diffractogramme RX indexés avec les données de référence de la fiche JCPDS n°01-070-4788 ainsi que l'attribution des bandes de vibration du spectre FTIR sont celles d'une phase de m-CPPT β pure. Ces diffractogrammes RX et spectre FTIR de la phase m-CPPT β synthétisée par nos soins selon la méthode de Gras *et al.* (Gras *et al.*, 2013a) nous serviront de référence pour la suite de cette étude.

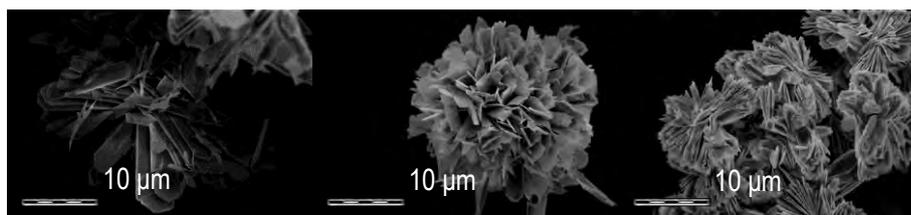


Figure I-11- Images en microscopie électronique à balayage de la phase *m*-CPPT β (Gras, 2014).

Tableau I-7- Paramètres de maille obtenus par Gras (Gras, 2014) et Balić-Žunić et al. (Balić-Žunić et al., 2000) pour la phase *m*-CPPT β . Les écarts-types estimés sont indiqués entre parenthèse.

Références	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
(Gras, 2014)	12,288(1)	7,512(1)	10,776(1)	90,00	112,51(1)	90,00
(Balić-Žunić et al., 2000)	12,287(6)	7,511(3)	10,775(5)	90,00	112,54(1)	90,00

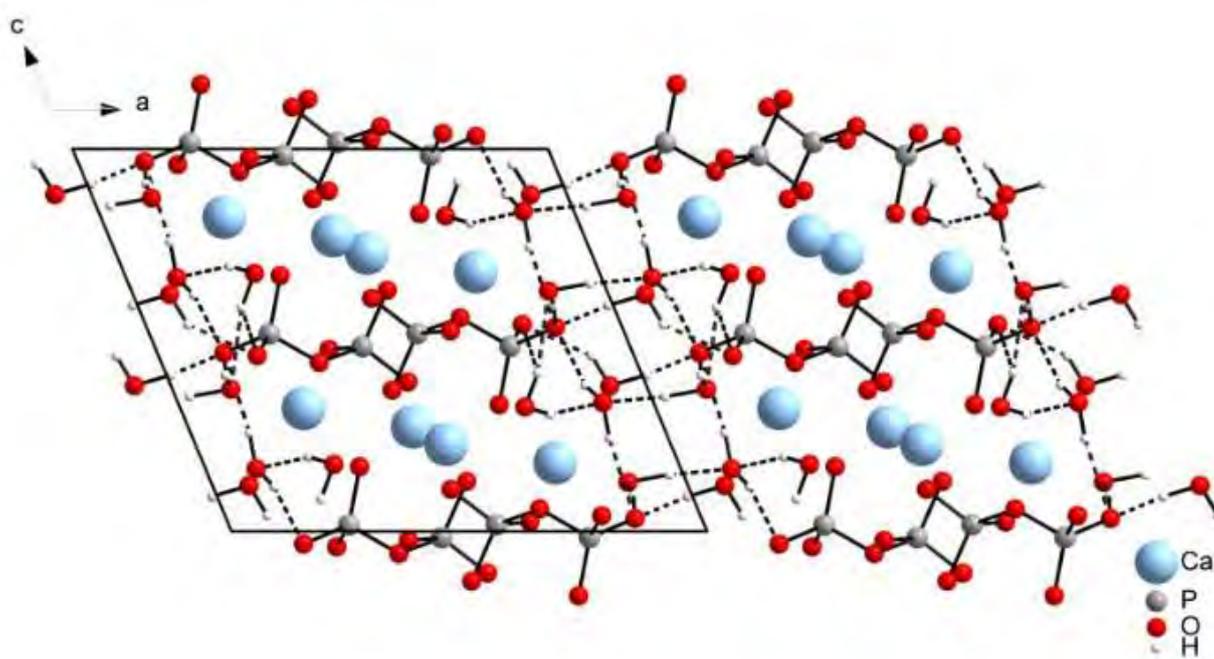


Figure I-12- Structure de la phase *m*-CPPT β suivant l'axe $[010]$ avec représentation des molécules de pyrophosphate organisées suivant l'axe $[100]$ et du réseau de liaisons hydrogène, en pointillé (Gras, 2014).

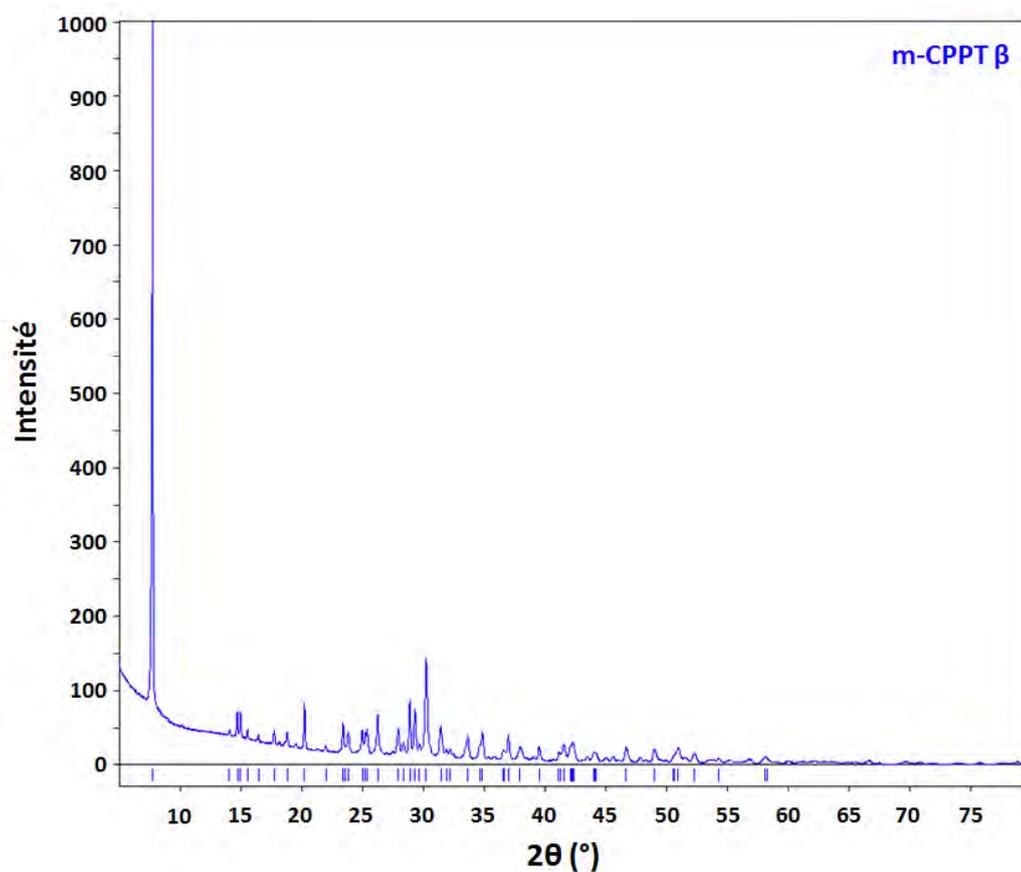


Figure I-13- Diagramme de diffraction des rayons X de phase *t*-CPPD indexé avec les données de référence de données de référence de la fiche JCPDS n°01-070-4788.

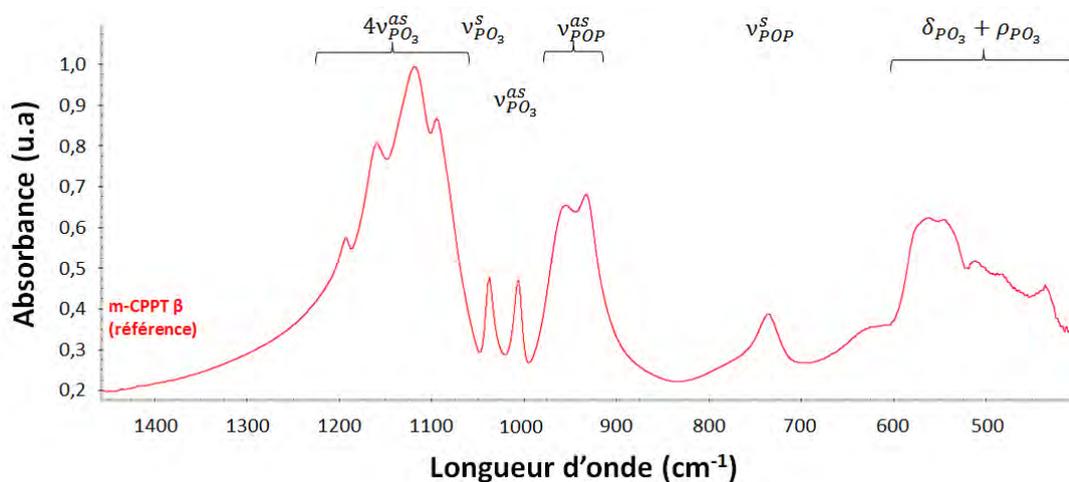


Figure I-14- Spectre FTIR de la phase *m*-CPPD β sur domaines 400-1400 cm^{-1} .

I-4-5 Le pyrophosphate de calcium amorphe (a-CPP)

Le pyrophosphate de calcium amorphe (a-CPP) de formule chimique $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ possède un nombre de molécules d'eau de constitution qui a été déterminé par différents auteurs comme étant compris entre $3,8 < n < 4,2$ (Gras et al., 2016a), (Slater et al., 2011);

Dans la mesure où cette phase est amorphe elle ne présente pas d'organisation à longue distance. La phase a-CPP a été étudiée par Slater *et al.* (Slater et al., 2011) par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du solide (RMN) et diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS). La structure locale de la phase amorphe a été décrite en termes de distances interatomiques issues de l'étude de la fonction de distribution de paires. Ces distances ont été reportées dans le Tableau I-8. Cette structure s'est révélée particulièrement stable en solution par rapport aux phases amorphes de phosphate de calcium ou de carbonate de calcium, qui présentent elles aussi un intérêt biologique car elles peuvent être rencontrées *in vitro* et *in vivo*. La phase amorphe de CPP a ainsi été décrite comme proche, par son organisation locale, de la phase cristallisée m-CPPT β et présente une gamme de nombre de molécules d'eau de constitution qui se situe autour de la valeur 4. Rappelons d'ailleurs que Gras (Gras, 2014) a démontré que la phase a-CPP est un précurseur *in-vitro* de la phase m-CPPT β .

Gras (Gras, 2014) a observé que les particules d'a-CPP (Figure I-15) présentent un faciès relativement sphérique et a montré que leur diamètre est d'environ 100 nm.

Le diffractogramme RX et le spectre FTIR de la phase a-CPP sont présentés sur les Figure I-16 et Figure I-17. Le fond continu du diffractogramme RX observé est caractéristique d'une phase d'a-CPP. De plus, l'attribution des bandes de vibration du spectre FTIR (Figure I-17) sont celles d'une phase d'a-CPP pure (Gras, 2014). Ce diffractogramme RX et ce spectre FTIR de la phase a-CPP synthétisée par nos soins selon la méthode de Gras *et al.* (Gras et al., 2013a) nous serviront de référence pour la suite de cette étude, notamment pour les études semi-quantitatives réalisées au chapitre II.

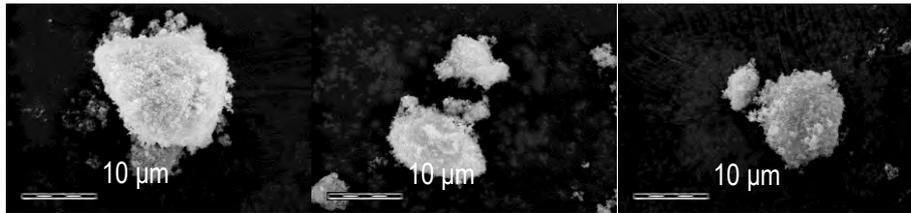


Figure I-15- Images en microscopie électronique à balayage de la phase a-CPP (Gras, 2014).

Tableau I-8- Distances interatomiques (\AA) des différentes liaisons impliqués dans la phase a-CPP, repris de Slater et al. (Slater et al., 2011) comparées à celles correspondant à la phase (Balić-Žunić et al., 2000) (Balić-Žunić et al., 2000) . Erreur estimée $\sim 0,02 \text{ \AA}$.

Composés	P—O	Ca—P	P—P	Ca—P
a-CPP	1,53	7,512(1)	10,776(1)	90,00
(Balić-Žunić et al., 2000)	1,54	7,511(3)	10,775(5)	90,00

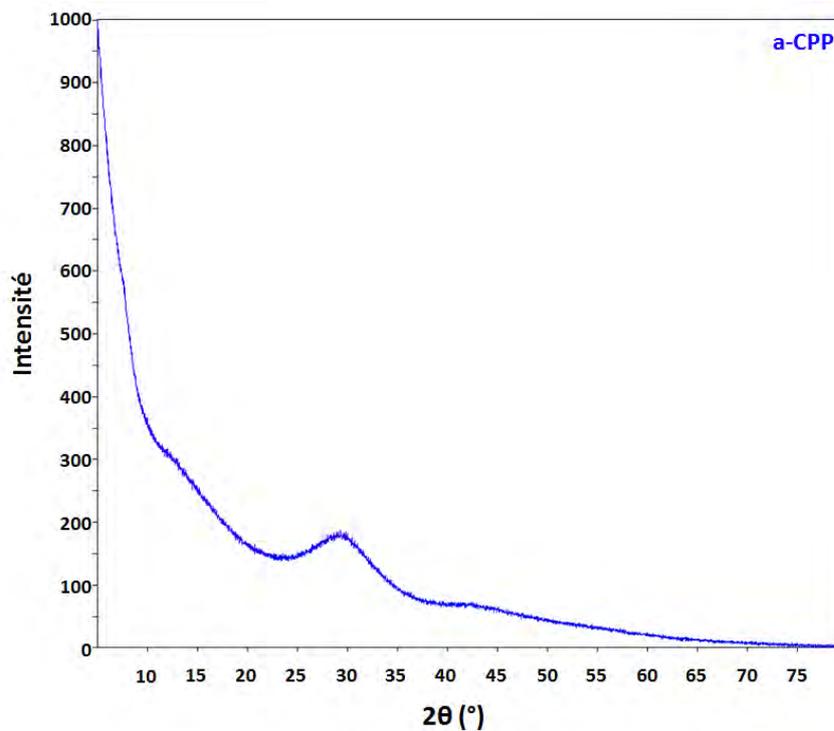


Figure I-16- Diagramme de diffraction des rayons X de phase a-CPP.

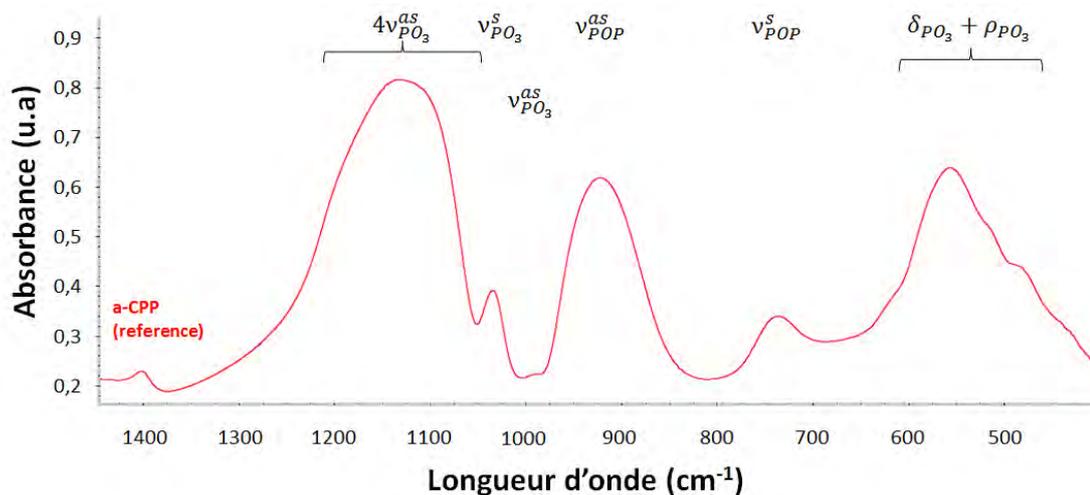


Figure I-17- Spectre FTIR de la phase a-CPP sur domaines 400-1400 cm^{-1} .

Il est important de connaître les structures et morphologies caractéristiques des phases pures de CPP étudiées pour pouvoir analyser et interpréter de potentiels changements dus aux additifs ioniques étudiés par la suite. En effet, un additif peut entraîner une modification de la structure cristalline et/ou changer la morphologie et le faciès cristallin. Gras (Gras, 2014) a également réalisé une analyse morphologique par simulations *ab initio* et a déterminé la morphologie des cristaux de CPP par la théorie Bravais-Fridel-Donnay-Harker (BFHD). De plus, il a déterminé de manière qualitative la réactivité de surface de chacune des faces des cristaux de CPP selon la théorie des orbitales frontières de Fukui. Ces travaux de modélisation lui ont permis d'estimer les sites préférentiels d'interaction avec les molécules du solvant pour les phases m-CPPD, t-CPPD et m-CPPT β . Ces calculs ont été effectués avec une interface en contact avec le vide. Des sites préférentiels d'interaction avec les molécules du solvant qui pourraient faciliter l'interaction avec des molécules étrangères chargées existent à la surface des cristaux de m-CPPD et t-CPPD (Gras 2014). Les résultats observés par Gras lui ont notamment permis de conclure qu'une adsorption de petites molécules (citrate, phosphocitrate, thiosulfate, bisphosphonate, ...) sur ces sites préférentiels d'interaction est possible. Concernant les cristaux de m-CPPT β les calculs n'ont pas permis la détermination de tels sites d'adsorption préférentielle.

La partie suivante portera sur les méthodes permettant d'obtenir les différentes phases de CPP dont il est question ici et qui font l'objet de cette thèse.

I-4-6 Méthodes de synthèse des pyrophosphates de calcium

I-4-6-1 Généralités

Les synthèses de pyrophosphates de calcium, reportées pour la première fois en 1827 par Thomas Clark et William Haidinger (C. Clark, T. T., 1827a) ; (C. Clark, T. T., 1827b) ; (Clark, T., 1827) ; (Haidinger, W., 1827)) avaient été réalisées à haute température, via la « chauffe au rouge » de phosphate de soude dans un bain de plomb fondu. C'est à cela que l'on doit l'introduction pour la première fois du terme de pyrophosphate pour caractériser cette famille de composés.

Par la suite, la méthode de Mandel *et al.* (Mandel et al., 1988) fut l'une des premières permettant l'obtention de cristaux de CPP purs et la plus utilisée d'après la littérature. Avec cette méthode l'obtention des phases de CPPD se fait indirectement par le biais de l'évolution successive de différents composés. Du dihydrogénophosphate de calcium dihydraté $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, est initialement utilisé pour former des cristaux d'acide pyrophosphorique $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ qui seront à leur tour utilisés comme précurseurs pour synthétiser les phases m- et t-CPPD.

Une solution de dihydrogénophosphate de calcium dihydraté est portée à 215°C pendant 30 min sous forte agitation magnétique (750 tr. min^{-1}) provoquant la réaction endothermique de formation des cristaux d'acide pyrophosphorique. Ces cristaux sont ensuite rincés à l'acétone et :

- Soit mis en suspension dans de l'eau distillée et maintenus à température ambiante sans agitation. Après 36 h les cristaux d'acide pyrophosphorique évoluent en cristaux de CPP dihydraté orthorhombique (o-CPPT) qui évoluent eux-mêmes en t-CPPD après 5 jours. La transformation est totale après sept jours de maturation.
- Soit mélangés à une solution de chlorure de magnésium à 80°C puis à une solution d'acétate de calcium. La solution ainsi obtenue forme un gel amorphe qui évolue en m-CPPD après une période de 24 h.

La formation de CPPD via la méthode Mandel *et al.* se fait donc par la réalisation d'étapes successives qui représentent autant de manipulations (changement de verrerie, rinçage...) ou le risque de contaminations des réactifs et du milieu rendent le contrôle des paramètres de synthèse difficile et la durée de la synthèse longue. Bien que ces méthodes permettent d'obtenir les phases de pyrophosphate de calcium, t-CPPD et m-CPPD, elles ne

sont pas adaptées à l'étude de l'influence d'additifs, que nous souhaitons mener notamment parce qu'elles mettent en jeu des étapes de maturation de composés intermédiaires. En effet, pour étudier l'influence d'additifs sur la formation des phases de CPPD d'intérêt biologique, il serait nécessaire de faire intervenir l'additif lors de la dernière étape de synthèse, car si l'additif était ajouté en amont il influencerait non pas la formation de CPPD mais la formation d'o-CPPT ou d'une phase amorphe. Il serait donc plus intéressant dans notre cas de disposer d'une méthode de synthèse directe des formes t-CPPD et m-CPPD.

I-4-6-2 Synthèse par précipitation directe

Parmi les méthodes de synthèse de pyrophosphate de calcium (CPP) publiées, la plus récente opérant par précipitation en milieu aqueux est la méthode de précipitation par double décomposition mise au point par Gras *et al.* (Gras *et al.*, 2013a). Elle permet de réaliser une synthèse sans intermédiaires en 45 minutes au lieu de 24 heures à une semaine pour celles publiées précédemment (Mandel *et al.*, 1988), (Brown *et al.*, 1963), (Christoffersen *et al.*, 2000). En outre, cette méthode permet d'obtenir des phases pures de façon rapide et reproductible, contrairement aux synthèses précédentes.

La méthode de Gras *et al.* permet de faire précipiter les différentes phases de CPP par double décomposition grâce à l'addition de deux solutions mères contenant respectivement du pyrophosphate de potassium et du nitrate de calcium, dans une solution tampon d'acétate d'ammonium à pH et à température contrôlés.

La réaction de précipitation ayant lieu est la suivante :



Généralement les deux paramètres les plus importants impliqués dans la précipitation de sels ayant différents états d'hydratation sont la température et le pH. Bien que d'autres paramètres tels que l'agitation ou la concentration des réactifs peuvent influencer la nature des phases formées, Gras *et al.* ont réalisé ces synthèses en considérant le couple pH-T comme variable (gamme de pH variant de 3,6 à 7,2, gamme de températures comprises entre 25°C et 90°C) et à partir de solutions de calcium et de pyrophosphate dans un rapport de concentrations fixé (rapport stœchiométrique constant Ca/Pyro = 1) et sous agitation magnétique constante (Gras *et al.*, 2013a). La Figure I-18 présente les domaines de couples

pH-température permettant la précipitation des différentes phases de CPP hydratés purs. Les zones restées blanches entre ces domaines correspondent aux conditions de précipitation conduisant à des mélanges de CPP.

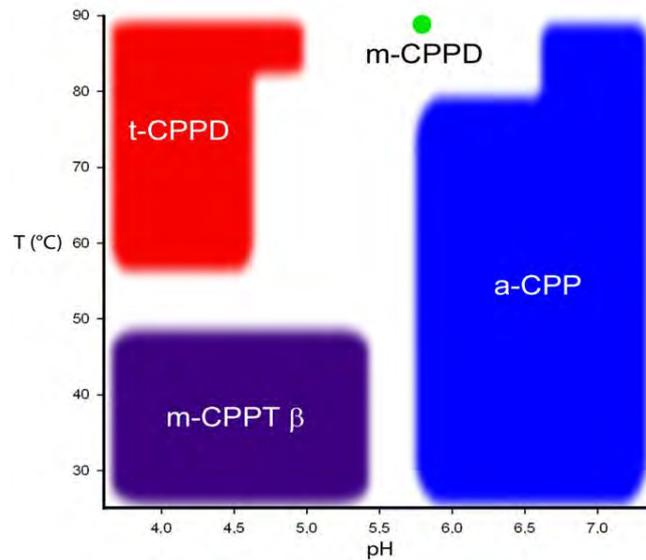


Figure I-18-Domains d'obtention des différentes phases pures de CPP (Gras et al., 2013a)

Le matériel utilisé pour les synthèses est décrit ci-après et représenté sur la Figure I-19. Les synthèses sont réalisées dans un erlenmeyer surmonté d'un réfrigérant, contenant un barreau aimanté et disposé sur une plaque d'agitation chauffante. Les solutions de sels de précurseurs utilisées lors de la synthèse sont ajoutées à l'aide d'une pompe péristaltique.

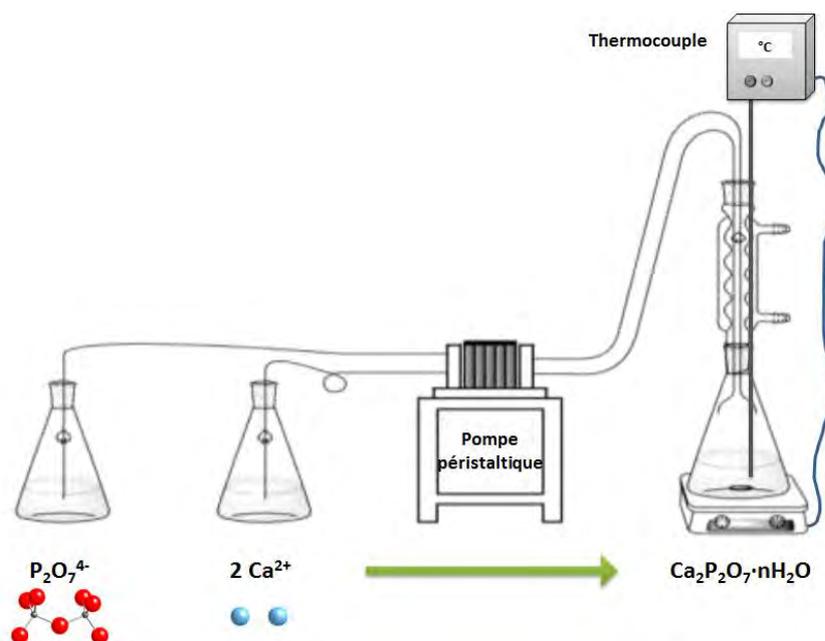


Figure I-19- Configuration standard du dispositif de synthèse des pyrophosphates de calcium hydratés par précipitation selon la méthode établie par Gras et al. (Gras et al., 2013b)

Le pH et la température de la solution tampon sont ajustés aux valeurs choisies d'après le diagramme établi (Figure I-18 ; Tableau I-9) selon la phase que l'on souhaite synthétiser. Les détails de la préparation des solutions mises en œuvre dans cette synthèse sont décrits dans divers documents de référence (Gras et al., 2013b), (Gras, 2014).

La double décomposition des réactifs est obtenue par addition simultanée en continu et à débit constant des deux solutions de réactifs, de pyrophosphate de potassium d'une part et de nitrate de calcium d'autre part dans un erlenmeyer agité contenant la solution tampon à pH et température contrôlés.

A la fin de l'addition des solutions de réactifs dans la solution tampon, le précipité formé est maintenu sous agitation pendant environ 10 min puis il est filtré à l'aide d'un Büchner et rincé avec de l'eau dé-ionisée. Ce précipité est ensuite séché dans une étuve à 37°C pendant au moins 12 heures.

L'échantillon ainsi obtenu est conservé à température ambiante dans un pilulier fermé. Aucune altération des cristaux n'a été constatée après plus de deux ans de stockage dans ces conditions.

Tableau I-9 Conditions de synthèse (couple température / pH) pour les différentes phases de pyrophosphate de calcium hydraté (Gras et al., 2013a)

	a-CPP	m-CPPT β	m-CPPD	t-CPPD
Température	25°C	25°C	90°C	90°C
pH	5,8	4,5	5,8	3,6

Cette méthode permet notamment de synthétiser la phase m-CPPD pure ; cette phase a été peu étudiée dans la littérature. Comme le montre la Figure I-18 les conditions de formation de cette phase correspondent à un domaine de pH-T extrêmement étroit (limité à un seul point). On peut par ailleurs noter que contrairement aux précédentes méthodes de synthèse reportées dans la littérature, cette méthode de synthèse ne fait pas intervenir d'ions Mg^{2+} , le sel de nitrate de calcium commercial utilisé dans le cadre de cette synthèse contient moins de 100 ppm d'ion Mg^{2+} . Toutefois, Cheng *et al.* (Cheng et al., 1980) (Cheng and Pritzker, 1981) ont montré qu'une concentration élevée en magnésium favorise la formation de m-CPPD. Ces ions sont d'ailleurs utilisés à cet effet dans la méthode de synthèse développée par Mandel *et al.* (Mandel et al., 1988). Cependant les ions pyrophosphate sont

approximativement cinq fois plus aptes à complexer les ions Mg^{2+} que les ions Ca^{2+} (Van Wazer and Callis, 1958) (Tableau I-10) ce qui pourrait être à l'origine de la présence d'ions Mg^{2+} dans les phases de pyrophosphate de calcium. Ce point peut en partie expliquer pourquoi il est si difficile d'obtenir une phase pure de cristaux de m-CPPD et pourquoi sa structure est restée irrésolue ces cinquante dernières années depuis sa première préparation et caractérisation par diffraction des rayons X.

Tableau I-10- Capacité des ions pyrophosphate et tripolyphosphate à complexer les cations Mg^{2+} et Ca^{2+} (selon (Van Wazer and Callis, 1958) et (Bobtelsky and Kertes, 1954).

	Moles d'ions métalliques complexées pour 100 moles de phosphate	
	Mg^{2+}	Ca^{2+}
Pyrophosphate	52	11
Tripolyphosphate	pas de précipité	29

Lors de cette thèse nous chercherons à analyser l'effet d'additifs sur la formation et la dissolution des différentes phases pures de CPP présentées dans ce chapitre. Un premier verrou important à lever sera la possibilité de finement contrôler les paramètres de synthèse des CPP, en particulier les conditions hydrodynamiques pour un volume de solution plus important. Il faudra pour cela transposer le protocole de synthèse décrit ci-dessus dans un réacteur de précipitation parfaitement agité. Le choix de développer ce dernier protocole est dû à tous les points forts qu'il présente vis-à-vis des autres protocoles précédemment présentés. Cette synthèse est directe à partir d'un précurseur de pyrophosphate (sans maturation de phases intermédiaires), bien plus rapide que les autres, répétable et reproductible notamment grâce à la maîtrise des paramètres expérimentaux (pH, température) à chaque instant de la synthèse. Avant de réaliser cette transposition de synthèse par précipitation nous rappellerons d'abord les principes généraux de la précipitation et dissolution qui interviennent lors de telles expérimentations.

I-5 Les principes généraux de la précipitation et de la dissolution

Cette partie est consacrée à la présentation des principes généraux de la précipitation et plus particulièrement des cinétiques de germination et de croissance cristalline et l'influence des paramètres du procédé sur celles-ci.

La définition du terme « précipitation » peut être opposée au terme plus général de « cristallisation ». La précipitation est une notion difficile à définir. En effet, comme l'exposent Söhnel et Garside (Söhnel and Garside, 1992) il n'y a pas de ligne de démarcation précise entre les deux phénomènes cristallisation et précipitation. Outre la formation éventuelle d'un précipité amorphe avant la formation d'une phase cristallisée, la précipitation peut être interprétée comme une cristallisation réactive, rapide dont la rapidité est la conséquence d'une forte sursaturation au cours de laquelle la cristallisation (changement de phase liquide - solide (cristal)) a lieu.

Quelques notions fondamentales de précipitation en solution basées sur les ouvrages de Söhnel et Garside (Söhnel and Garside, 1992), Mullin (Mullin, 2001) et Myerson (Myerson, 2002) seront abordées dans cette partie.

I-5-1 La sursaturation

La sursaturation est la variable clé de la précipitation et son niveau gouverne les vitesses de germination, croissance et murissement d'Ostwald. La précipitation d'un composé i est généralement réalisée en mélangeant deux solutions réactives.

La force motrice de la réaction de précipitation ou sursaturation est définie par l'écart de potentiel chimique entre la solution et son état à l'équilibre de solubilité : le potentiel chimique du soluté en solution μ_i^L est supérieur au potentiel chimique de la solution à l'équilibre.

Or à l'équilibre le potentiel chimique d'un soluté i en phase solide (de composition fixe) est égal au potentiel chimique de i en solution saturée :

$$\mu_i^{L,eq}(T, P) = \mu_i^S(T, P) \quad (I-2)$$

La force motrice de la précipitation ou sursaturation $\Delta\mu_i$ est définie comme étant la différence de potentiel chimique du soluté dans la solution mère sursaturée μ_i^L et le potentiel

chimique correspondant à l'état thermodynamiquement stable (équilibre) pour lequel les cristaux existent $\mu_i^{L, \text{éq}}$:

$$\Delta\mu_i = \mu_i^L - \mu_i^{L, \text{éq}} \quad (I-3)$$

Cette expression de la sursaturation est développée dans le paragraphe suivant en fonction des activités des espèces.

Rappelons juste ici que lorsque le coefficient d'activité des solutions est égal à 1, la sursaturation est définie comme l'écart entre la concentration réelle du soluté et sa solubilité. On peut la faire varier en changeant la concentration en soluté ou la température. Elle peut être définie par l'une des trois expressions suivantes :

- la sursaturation absolue : $\Delta C = C - C_s$ (I-4)

- la sursaturation relative : $\sigma = \Delta C / C_s$ (I-5)

- le rapport de sursaturation : $S = C / C_s = \sigma + 1$ (I-6)

C_s est la concentration à l'équilibre et C celle du soluté dans la solution. Les deux derniers types de sursaturation sont adimensionnelles.

Dans une solution sous saturée, l'introduction de germes de soluté dans cette solution conduit à leur dissolution. Dans une solution instable (ayant un niveau de sursaturation élevée) la nucléation est spontanée alors que dans une solution sursaturée métastable la vitesse de nucléation est extrêmement lente et la barrière énergétique assez élevée. C'est pourquoi la probabilité d'apparition spontanée de cristaux est faible et qu'on parvient difficilement à observer la nucléation. Dans cette solution métastable, l'introduction de germes conduit à leur croissance.

La sursaturation évolue au cours d'un procédé de précipitation et elle peut également être non-homogène au sein du réacteur selon l'hydrodynamique imposée dans le réacteur. Ces variations dépendent en particulier du processus de mélange des réactifs et de leur agitation.

I-5-2 Produit de solubilité et rapport de sursaturation

I-5-2-1 Définition

La solubilité est la quantité maximale de solide que l'on peut dissoudre dans une quantité de solvant donnée, à pression et température données. La solution ainsi obtenue est alors saturée. Différents paramètres peuvent influencer la solubilité : température, pression, pH, force ionique, présence d'autres espèces ioniques en solution ayant un ion semblable au produit qui précipite (effet d'ion commun).

La sursaturation est l'état d'une solution dont la concentration en soluté est supérieure à sa solubilité.

Lorsqu'un sel peu soluble est produit par réaction chimique (comme dans le cas des pyrophosphates de calcium), il y aura en fin de réaction apparition d'un équilibre entre le solide précipité et les ions dans la solution. Cet état d'équilibre peut être décrit par le produit de solubilité. Le produit de solubilité est, dans le cas d'un composé solide se dissociant en solution, la constante d'équilibre de la réaction de dissolution. Cette constante est notée K_S .



La constante d'équilibre de cette réaction est appelée produit de solubilité (K_S) et est caractéristique du solide étudié.

En effet, les potentiels chimiques des ions et du précipité sont exprimés par les équations suivantes :

$$\mu_{A^{n+}} = \mu_{A^{n+}}^0 + RT \ln(a_{A^{n+}}) \quad (I-8)$$

$$\mu_{B^{m-}} = \mu_{B^{m-}}^0 + RT \ln(a_{B^{m-}}) \quad (I-9)$$

$$\mu_{A_m B_n} = \mu_{A_m B_n}^0 + RT \ln(a_{A_m B_n}) \quad (I-10)$$

L'activité de l'espèce chimique « a » correspond à la concentration active de cette espèce, c'est-à-dire à la quantité de molécules/ions par unité de volume disponible pour la

réaction. Le facteur correctif de la concentration s'appelle le coefficient d'activité γ_i . L'activité s'exprime sous la forme :

$$a_i = \gamma_i C_i \quad (I-11)$$

où C_i est la concentration de l'espèce chimique i .

A l'équilibre, le potentiel chimique de la solution est égal au potentiel chimique du précipité, on obtient :

$$m \mu_{A^{n+}} + n \mu_{B^{m-}} = \mu_{A_m B_n}^0 + RT \ln(a_{A_m B_n}) \quad (I-12)$$

En considérant le solide pur dans son état standard de référence, son activité est égale à 1. On peut donc simplifier l'équation et en explicitant les potentiels chimiques des espèces A et B par les relations (I-9) et (I-10), on a la relation :

$$\mu_{A_m B_n}^0 - m \mu_{A^{n+}}^0 - n \mu_{B^{m-}}^0 = RT \ln(a_{A^{n+}}^m \cdot a_{B^{m-}}^n) \quad (I-13)$$

où :

$$K_S = a_{A^{n+}}^{m(eq)} \cdot a_{B^{m-}}^{n(eq)} \quad (I-14)$$

K_S représente la constante d'équilibre entre phases. C'est le produit de solubilité du système.

Ainsi, pour l'électrolyte $A^{n+}B^{m-}$ le taux de sursaturation S , qui représente l'écart à l'équilibre peut être défini comme le rapport entre produit de concentration et le produit de solubilité tous deux définis en termes d'activités des espèces :

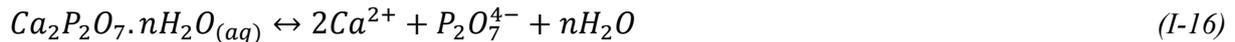
$$S = \left(\frac{a_{A^{n+}}^m \cdot a_{B^{m-}}^n}{K_S} \right)^{1/m+n} \quad (I-15)$$

D'autres définitions du rapport de sursaturation S telles que celles définies par les équations (I-5) et (I-6) peuvent être trouvées dans la littérature mais c'est la définition représentée par l'équation (I-15) qui sera utilisée pour tous les calculs de sursaturation via la

modélisation des équilibres des solutions aqueuses de pyrophosphate de calcium abordée au paragraphe I-5-3.

I-5-2-2 Cas des pyrophosphates de calcium

Le produit de solubilité de la dissolution d'un pyrophosphate de calcium peut s'écrire en considérant l'équation de réaction suivante :



Il est alors défini par l'équation suivante :

$$K_S = ([Ca^{2+}]^2 \cdot [P_2O_7^{4-}]) \quad (I-17)$$

Peu de travaux ont été réalisés sur la solubilité des pyrophosphates de calcium. McCarty *et al.* (McCarty *et al.*, 1971) ont déterminé pour la première fois en 1971 quelques points de solubilité à 37°C dans différents fluides ayant un pH compris entre 7,3 et 7,8. Puis entre 1999 et 2002, Christoffersen *et al.* (Christoffersen *et al.*, 2000) (Christoffersen *et al.*, 1999) ont déterminé les pKs de trois différentes phases de pyrophosphate de calcium à pH 7 et 37°C. Cependant les méthodes de synthèse des composés mises en œuvre dans ces différents travaux n'ont pas été précisément décrites et certains composés comme le m-CPPD utilisé par ces auteurs n'étaient pas parfaitement purs. Les données de solubilité disponibles dans la littérature sont reportées dans les Tableau I-11 et Tableau I-12.

On observe d'après les données du Tableau I-12 que la solubilité des CPPD diminue ou augmente avec l'augmentation respective de la concentration en calcium ou magnésium. Lorsque les quantités de calcium et magnésium sont égales leur effet sur la solubilité se compense et cette dernière reste inchangée vis-à-vis de la solubilité des CPPD en l'absence de calcium et magnésium. La variation du pH entre 7,05 et 7,08 n'a pas d'effet notable sur la solubilité. En moyenne les solubilités des CPPD dans de l'eau distillée, du liquide synovial dialysé dans du trishydroxyméthylaminométhane (Tris) ou une solution de Tris contenant du calcium et du magnésium en quantité égale sont les mêmes. Ces résultats laissent supposer que les pKs déterminés par Christoffersen *et al.* (Christoffersen *et al.*, 2000) à pH 7 et 37°C dans une solution de nitrate de calcium, de force ionique finale égale à 0,1 M sont probablement très proches voire égaux aux pKs des CPPD dans le milieu articulaire.

Tableau I-11 Valeurs des pKs des différentes phases cristallines à pH 7 et 37°C déterminés dans une solution de nitrate de calcium de force ionique finale égale à 0,1 M et un pH ajusté avec du HNO₃ (2 mM) (Christoffersen et al., 2000).

Phases de CPP	pK _s
t-CPPD	18,35
m-CPPD	17,6
m-CPPT β	17,1

Tableau I-12 Solubilités d'un CPPD dans différents types de solution à 37°C (McCarty et al., 1971).

Fluid*	Acid Hydrolysis		Solubility (μg P/100 ml.) X ± S.D. (n=3)
	Before (μM P/ml. solution [mean])	After (μM P/ml. solution [mean])	
Distilled water	0.03	0.056	80 ± 13
Tris Cl 0,1M, pH 7,3	0.032	0.086	167 ± 9
Tris + 1 μM Pi	1.00	1.01	31 ± 1
Tris + 0,6 μM Pi	0.62	0.66	130 ± 31
Tris + 0,3 μM Pi	0.305	0.347	198 ± 4
Tris Cl 0,1M, pH 7,3	0.04	0.109	190 ± 44
Tris + Ca 0,1 mg.	0.025	0.044	53 ± 33
Tris + Ca 0,05 mg.	0.03	0.043	42 ± 8
Tris + Ca 0,025 mg.	0.025	0.027	5 ± 7
Tris + Mg 0,12 mg.	0.050	0.251	623 ± 15
Tris + Mg 0,006 mg.	0.065	0.190	394 ± 33
Tris + Mg 0,04 mg.	0.086	0.177	280 ± 88
Tris + BSA† 0,05 mg.	0.25	0.422	574 ± 73
Tris Cl 0,1M, pH 7,05	0.055	0.094	125 ± 11
Tris Cl 0,1M, pH 7,2	0.055	0.106	158 ± 0
Tris Cl 0,1M, pH 7,3	0.055	0.115	184 ± 20
Tris Cl 0,1M, pH 7,8	0.055	0.091	122 ± 7
Joint fluid No.1 dialyzed against Tris Cl fluid, pH 7,3	0.086	0.101	46 ± 13
Joint fluid No.2 dialyzed against Tris Cl fluid, pH 7,34	0.26	0.315	177 ± 14
Tris + Mg 0,1 mg.	0.26	0.356	287 ± 14
Tris + Mg 0,1 mg. + Ca 0,1 mg.	0.10	0.125	85 ± 16

*All materials added refer to final concentration per ml.

† Albumine de Sérum Bovin.

Pi phosphates inorganiques

Ainsi, bien que la solubilité de la majorité des composés inorganiques augmentent lorsque la température augmente, il est bien connue que les phosphates de calcium tels que ceux du système $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ étudié par Sarver et Brinton (Sarver and Brinton, 1927) (Figure I-20) ont une solubilité qui présente une évolution inversée ou rétrograde avec la température.

Sakamoto (Sakamoto, 1995) a établi en 1995 la courbe expérimentale de solubilité des CPPD (Figure I-21) qui prouve que la solubilité des CPPD présente une évolution rétrograde avec le pH tout comme pour les phosphates de calcium. Ces résultats sont en adéquation avec les valeurs de K_s déterminées par Christoffersen (Christoffersen et al., 2000) qui place la limite de solubilité des CPPD à environ $2 \cdot 10^{-6}$ M.

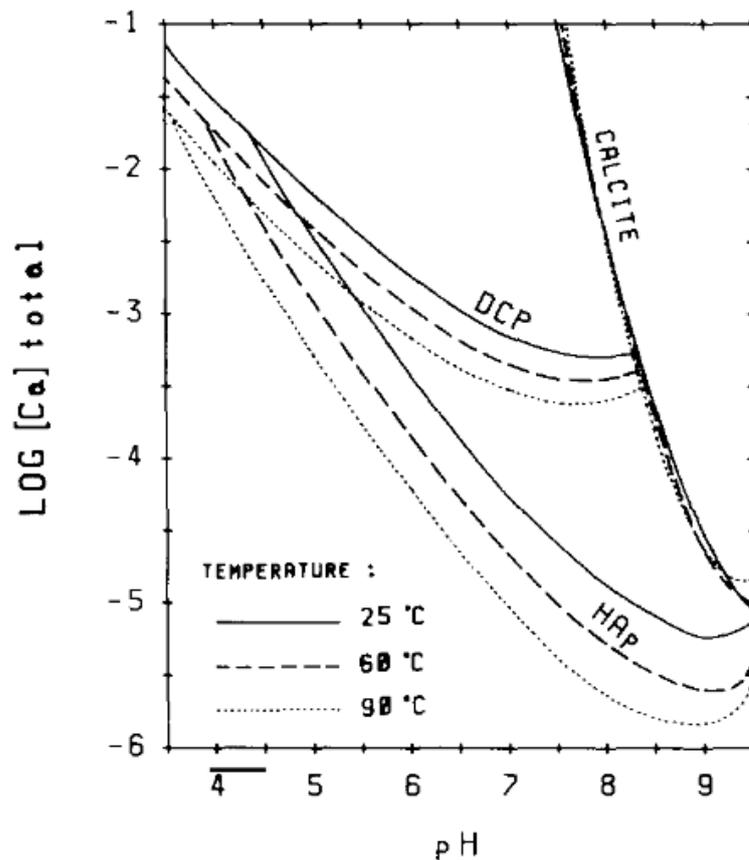


Figure I-20- Influence de la température sur les isothermes de solubilité de l'hydroxyapatite (HAP), phosphate dicalcique (DCP) et de la calcite dans le système $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ (Sarver and Brinton, 1927).

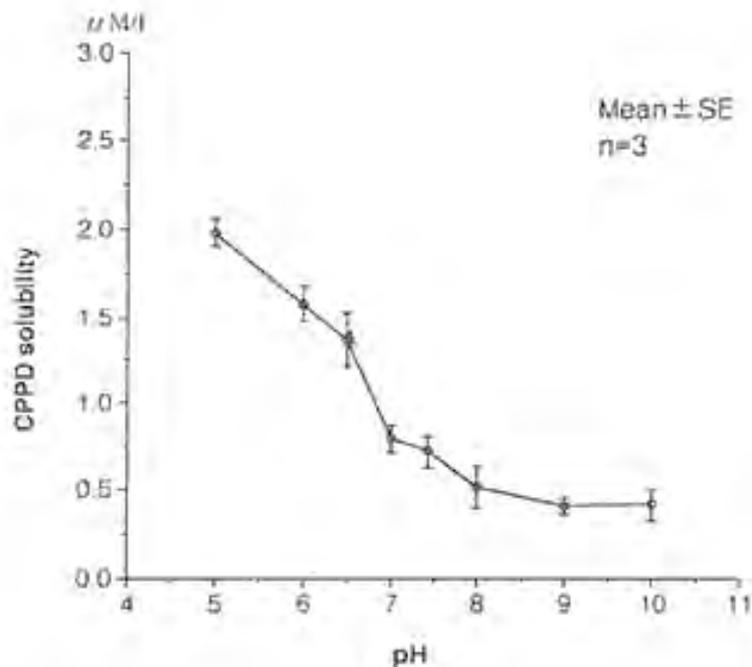


Figure I-21 - Courbe expérimentale de la solubilité des cristaux de CPPD en fonction du pH dans une solution tampon de glycérine (0,2 M) (Sakamoto, 1995).

I-5-3 Modélisation des équilibres des solutions aqueuses de pyrophosphate de calcium

La mise en oeuvre de la précipitation des pyrophosphates de calcium nécessite le calcul préliminaire de la sursaturation en fonction de la composition en électrolytes (même neutre) à force ionique et pH imposés. Les différents équilibres engagés dans le processus en fonction des ions présents doivent donc être pris en compte. Dans le cadre de ce travail ce sont les équilibres de dissociation des CPP, d'association des ions pyrophosphate et calcium (Tableau I-13) et leur spéciation (Figure I-22) qui sont importants. La figure I-22 donne les pourcentages des formes de pyrophosphate en solution prédominantes en fonction du pH. Cette courbe a été obtenue par le calcul d'après une approche classique qui consiste à dénombrer les espèces à prendre en compte, écrire les équilibres de dissociation, écrire les bilans de conservation de masse, respecter la neutralité électrique et enfin résoudre le système d'équations.

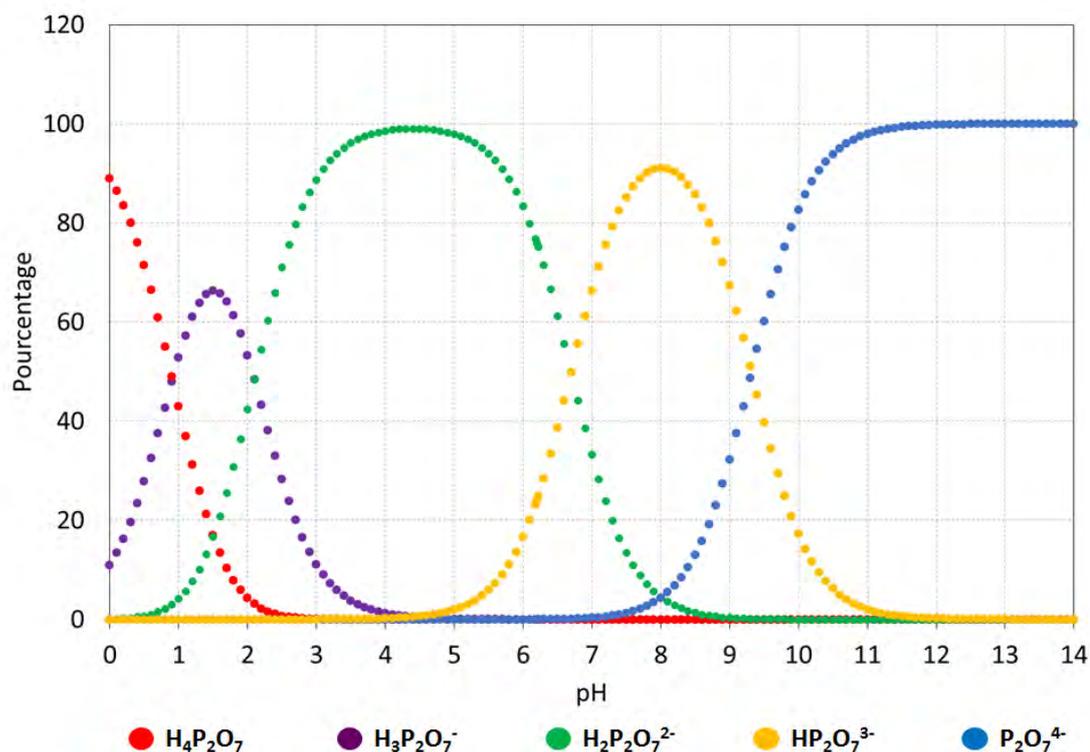


Figure I-22- Spéciation des ions pyrophosphates en solution en fonction du pH.

Tableau I-13 – Liste des équilibres de dissociation des CPP et d'association des ions pyrophosphate et calcium (Christoffersen et al., 1999).

Réactions d'équilibre	Constantes thermodynamiques (Ks = produit de solubilité)	
$H^+ + P_2O_7^{4-} = HP_2O_7^{3-}$	Log(Ks) = 9,6 $\Delta H = 1,897 \text{ kJ}$	(I-18)
$H^+ + HP_2O_7^{3-} = H_2P_2O_7^{2-}$	Log(Ks) = 6,7	(I-19)
$H^+ + H_2P_2O_7^{2-} = H_3P_2O_7^-$	Log(Ks) = 2,0 $\Delta H = -3,126 \text{ kJ}$	(I-20)
$Na^+ + P_2O_7^{4-} = NaP_2O_7^{3-}$	Log(Ks) = 2,3	(I-21)
$Ca^{2+} + P_2O_7^{4-} = CaP_2O_7^{2-}$	Log(Ks) = 6,5	(I-22)
$Ca^{2+} + HP_2O_7^{3-} = CaHP_2O_7^-$	Log(Ks) = 4,3	(I-23)
$Ca_2(P_2O_7) = 2Ca^{2+} + P_2O_7^{4-}$	Log(Ks) = -18,35	(I-24)
$Ca_2(P_2O_7).2H_2O = 2Ca^{2+} + P_2O_7^{4-} + 2H_2O$	Log(Ks) = -17,6	(I-25)
$Ca_2(P_2O_7) = 2Ca^{2+} + P_2O_7^{4-}$	Log(Ks) = -17,1	(I-26)
$CaH_2P_2O_7 = Ca^{2+} + H_2P_2O_7^{2-}$	Log(Ks) = -17,1	(I-27)
$CaH_2P_2O_7 = Ca^{2+} + H_2P_2O_7^{2-}$	Log(Ks) = -2,7	(I-28)
$H_4P_2O_7 = H^+ + H_3P_2O_7^-$	Log(Ks) = -1,5 $\Delta H = 2,541 \text{ kJ}$	(I-29)

Le programme PHREEQC sera utilisé pour les calculs de sursaturation en fonction des concentrations en nitrate de calcium et pyrophosphate de potassium et autres électrolytes neutres, à force ionique et pH imposés. Ce programme permettant de réaliser entre autres la spéciation de solutions via des calculs chimiques pouvant être couplés avec des équations de transfert de matière par advection et/ou diffusion a initialement été développé par l'USGS (Institut d'études géologiques des États-Unis) pour des applications géologiques. Les bases de données d'origine alors utilisées par PHREEQC ne comportaient pas les différents équilibres répertoriés dans le Tableau I-13. C'est pourquoi nous avons modifié la base de données d'origine nommée « minteq » pour y inclure les données thermodynamiques concernant les pyrophosphates de calcium et ions associés. Notons que dans PHREEQC la sursaturation relative (σ) vis-à-vis d'une phase solide est définie comme étant le ratio du produit d'activité ionique lié à la dissolution du solide sur le produit de solubilité du solide tel que :

$$SI = \log(\sigma) \quad (I-30)$$

avec SI l'indice de sursaturation d'une phase donnée déterminé par PHREEQC.

L'utilisation de mots clés tels que l'instruction « solution » lors de la rédaction d'un programme PHREEQC permet de définir une solution aqueuse. Le logiciel calcule ensuite la spéciation chimique des éléments selon le modèle d'équilibre thermodynamique, représenté à l'aide des lois d'action de masse dans lesquelles les activités des espèces en solution interviennent. Ces activités sont liées aux coefficients d'activité (équation (I-11) eux-mêmes déterminés d'après un modèle de solution aqueuse. Différents modèles de solution aqueuse disponibles dont celui utilisé pour le cas des CPP sont décrits dans les paragraphes qui suivent.

I-5-4 Détermination du coefficient d'activité: modèles thermodynamiques

I-5-4-1 Modèle de Pitzer

Le modèle de Pitzer (Pitzer, 1973) ; (Pitzer, 1991) est la théorie la plus précise pour représenter les solutions non-idéales. La théorie utilisée s'applique pour des calculs de coefficients d'activité d'ions à différentes valences et à forte force ionique. Le modèle de

Pitzer consiste à décomposer l'énergie d'excès de Gibbs du système sous la forme d'un développement du viriel :

$$\frac{G^{ex}}{w_w RT} = f(I) + \sum_i \sum_j m_i m_j \lambda_{ij}(I) + \sum_i \sum_j \sum_k m_i m_j m_k \mu_{ijk} + \dots \quad (I-31)$$

avec :

- G^{ex} : énergie d'excès de Gibbs (J),
- w_w : masse de l'eau (kg),
- R : constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$),
- $f(I)$: terme dépendant de la loi de Debye-Hü kel (ce terme ne dépend que de la force ionique) (mol/kg de solvant),
- m_i : molalité de l'ion (mol/kg de solvant),
- $\lambda_{ij}(I)$: ce terme représente les interactions à courte distance entre les particules i et j ; Ce terme est assimilé au second coefficient du viriel,
- μ_{ijk} : ce terme décrit les interactions triples à courte distance entre les espèces i, j et k ; Il est assimilé au troisième coefficient du viriel.

D'autres termes considérant des interactions quadruples ou plus peuvent être ajoutés. Pitzer exprime le coefficient d'activité sous la forme :

$$\ln \gamma_i = \left[\frac{\partial \left(\frac{G^{ex}}{w_w RT} \right)}{\partial m_i} \right]_{n_w} \quad (I-32)$$

avec n_w le nombre de moles de solvant, relation qui peut également s'écrire :

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^{DH} + \sum_j \beta_{ij}(I) m_j + \sum_j \sum_k C_{ijk} m_j m_k + \dots \quad (I-33)$$

Avec γ_i^{DH} un coefficient d'activité issue d'une forme modifiée de Debye-Hü kel fonction de la force ionique I , β_{ij} et C_{ijk} correspondent aux interactions spécifiques entre

chaque ion. β_{ij} correspond aux interactions binaires entre 2 ions et dépend de la force ionique. C_{ijk} correspond quant à lui à l'interaction entre trois ions et est considéré indépendant de la force ionique. Une description détaillée de la forme de l'équation est donnée par Pitzer (Pitzer, 1973).

I-5-4-2 Modèle de Debye-Hückel et extensions

Pour des solutions non idéales, le modèle le plus simple est celui de Debye-Hückel (Debye and Hückel, 1923). Selon cette théorie, le coefficient d'activité d'un ion dépend de la valence de l'ion, de la force ionique et de la distance minimale (d) d'approche des ions :

$$\ln \gamma_i = - \frac{A_{DH} z_i^2 \sqrt{I}}{1 + B_{DH} d \sqrt{I}} \quad (I-34)$$

A_{DH} et B_{DH} sont des paramètres qui ne dépendent que de la température et des propriétés du solvant :

$$A_{DH} = \sqrt{2\pi N_A \rho} \left(\frac{e^{*2} B_{DH}}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r k_B T} \right)^{3/2} \quad (I-35)$$

$$B_{DH} = \sqrt{\frac{2F^2 \rho}{\epsilon_0 \epsilon_r R T}} \quad (I-36)$$

avec :

- N_A : nombre d'Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$),
- ρ : masse volumique ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$),
- e^* : charge de l'électron (C),
- ϵ_0 : permittivité du vide ($\text{C}^2 \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$),
- ϵ_r : constante diélectrique relative du milieu (-),
- R : constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$),
- F : nombre de Faraday ($96452,34 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$).

La théorie de Debye-Hü kel considère uniquement les interactions coulombiennes à longue portée entre les espèces chargées électriquement, mais ne prend pas en compte les interactions répulsives à courte portée. C'est pourquoi cette théorie n'est valable que pour des solutions diluées, dont la force ionique est inférieure à 0,1 mol.L⁻¹. Le modèle de Davies (Davies, 1962), dont l'expression empirique est rappelée dans l'équation (I-37), permet également de déterminer le coefficient d'activité pour de faibles forces ioniques, jusqu'à 0,1 mol.L⁻¹.

$$\ln \gamma_i = -0,5z_i^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0,3I \right) \quad (I-37)$$

D'autres modèles ont étendu la théorie de Debye-Hü kel, telle que la théorie SIT (Specific ion Interaction Theory), proposée par Brønsted (Brønsted, 1922) puis développée par Guggenheim et Turgeon (Guggenheim and Turgeon, 1955), qui comporte un coefficient d'interaction entre ions de charge opposée :

$$\ln \gamma_i = -z_i^2 DH + \sum_j \varepsilon(i, j, I) m_j \quad (I-38)$$

avec :

- DH : terme de Debye-Hü kel,
- ε : coefficient d'interactions ioniques,
- m_j : molalité de l'espèce.

Les coefficients d'interactions ioniques sont déterminés expérimentalement à partir des constantes d'équilibre déterminées dans des milieux ioniques différents et à différentes forces ioniques.

Bromley (Bromley, 1973) propose également une extension de Debye-Hü kel, avec l'expression suivante :

$$\ln \gamma_i = -\frac{A_{DH}z_i^2\sqrt{I}}{1 + B_{DH}d\sqrt{I}} + \frac{(0,06 + 0,6B)z_i^2I}{\left(1 + \frac{1,5}{z_i^2}I\right)^2} + BI \quad (I-39)$$

B est un paramètre d'interaction ionique. Ce modèle peut être utilisé dans le cas d'un mélange comportant plus de deux ions. Ce modèle est valide jusqu'à une force ionique de 6 mol.L⁻¹.

Dans le cas des pyrophosphates le modèle utilisé est celui de Davies (Equation (I-37)).

I-5-5 La nucléation

Dans une solution sursaturée, la nucléation est l'étape de formation de cristaux. Elle peut apparaître de manière spontanée ou être déclenchée artificiellement (par agitation, chocs mécaniques, friction, etc.). Il n'y a à ce jour pas d'accord général sur la nomenclature de la nucléation. Pour éviter toute confusion Mullin (Mullin, 2001) a défini les terminologies suivantes : le terme « primaire » est réservé au système pour lequel la nucléation intervient alors qu'aucune matière cristalline n'était présente dans le système de départ. D'autre part, des germes se développent souvent autour de cristaux déjà présents dans des systèmes sursaturés ; ce comportement fait référence à une nucléation dite « secondaire » (Figure I-23).

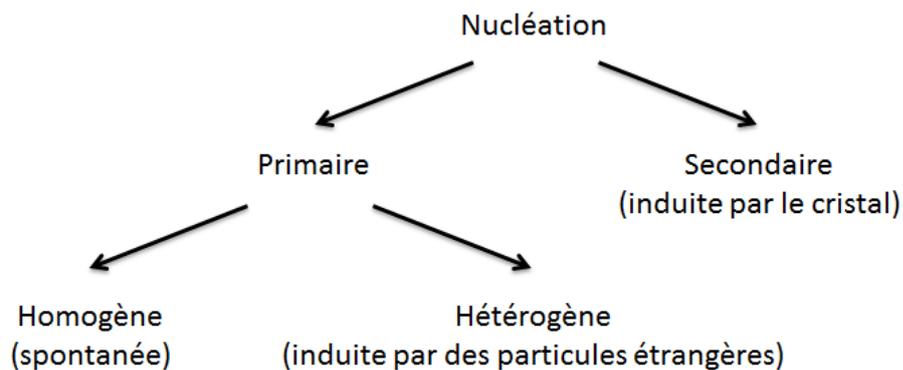


Figure I-23-Les différents types de nucléation selon Mullin (Mullin, 2001)

Il existe deux types de nucléation primaire : la nucléation homogène qui a lieu dans un milieu exempt de toute particule/surface (sauf parois du réacteur) et la nucléation hétérogène ayant lieu en présence de particules étrangères dans la solution.

***La nucléation homogène**

La théorie classique de nucléation découlant du travail de Gibbs (Gibbs, 1948), est basée sur l'analogie avec la condensation de vapeur en liquide, théorie qui peut être étendue à la cristallisation de solutés. Le changement d'énergie libre associé au processus de nucléation homogène, enthalpie libre d'excès de Gibbs ΔG , est décrit par l'équation suivante :

$$\Delta G = \Delta G_S + \Delta G_V \quad (I-40)$$

Avec ΔG_S , enthalpie libre de surface correspondant à l'énergie nécessaire à la création de la surface du germe. Elle est toujours positive. Cette quantité est proportionnelle à la surface du germe créée c'est-à-dire à r^2 , r étant le rayon du germe supposé sphérique et γ est la tension interfaciale. On peut alors écrire :

$$\Delta G_S = 4\pi r^2 \gamma \quad (I-41)$$

ΔG_V est l'enthalpie libre de volume correspondant au passage de l'état liquide à l'état cristallin. Cette énergie est négative car le changement de phase liquide-solide implique une diminution de mobilité des molécules/ions. Elle est décrite par l'équation suivante :

$$\Delta G_V = -\frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v \quad (I-42)$$

avec ΔG_v , l'enthalpie libre de changement d'état par unité de volume et r le rayon du germe supposé sphérique.

On obtient alors :

$$\Delta G_V = 4\pi r^2 \gamma - \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v \quad (I-43)$$

Les deux termes de cette équation étant de signe opposé et dépendant différemment de r , l'enthalpie libre ΔG passe par un maximum (Figure I-24). Cette valeur ΔG_{crit} , correspond à la quantité d'énergie nécessaire à la formation du germe de taille critique. La taille de ce germe critique (r_c) est obtenue pour le point maximum de la courbe (I-43) :

$$\frac{d\Delta G}{dr} = 0 \quad (I-44)$$

soit

$$\frac{d\Delta G}{dr} = 8\pi r\gamma + 4\pi r^2\Delta G_v = 0 \quad (I-45)$$

d'où

$$r_c = \frac{-2\gamma}{\Delta G_v} \quad (I-46)$$

où ΔG_v est une quantité négative. A partir de l'équation (I-43), on obtient l'équation (I-46) :

$$\Delta G_{crit} = \frac{16\pi\gamma^3}{3(\Delta G_v)^2} = \frac{4\pi\gamma r_c^2}{3} \quad (I-47)$$

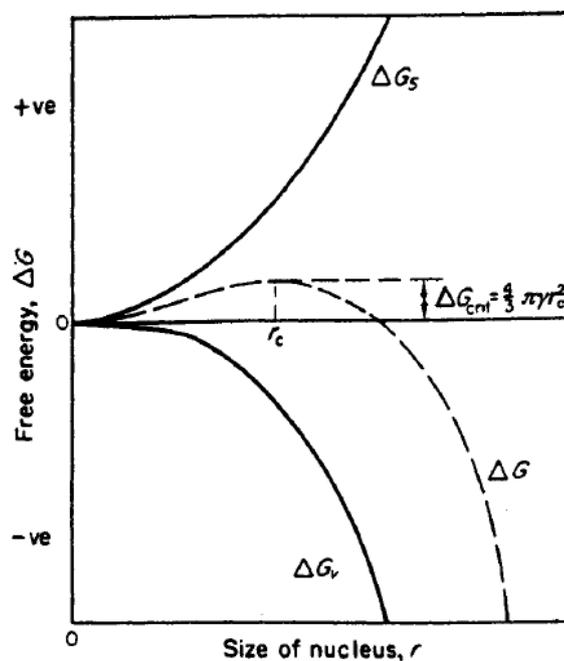


Figure I-24- Diagramme de l'enthalpie libre associée à la formation d'un germe critique : on peut distinguer l'évolution de l'enthalpie libre associée à la création de la surface d'un germe (ΔG_s) et du volume du germe (ΔG_v) (Mullin, 2001)

Le comportement des germes nouvellement créés dans une solution sursaturée dépend de leur taille. La taille critique r_c représente la taille minimale d'un germe stable. Les particules ayant un rayon inférieur à r_c se dissolvent de sorte à réduire l'énergie libre et celles ayant un rayon supérieur à r_c continuent de grossir.

La vitesse de nucléation J , correspondant au nombre de germes formés par unité de temps et de volume, peut être exprimée sous la forme de la loi d'Arrhenius communément utilisée pour décrire la variation de la vitesse de processus thermiquement activés :

$$J = A \exp(-\Delta G/kT) \quad (I-48)$$

La relation basique de Gibbs-Thomson pour les non-électrolytes peut être écrite par l'équation suivante :

$$\ln S = \frac{2\gamma v}{kTr} \quad (I-49)$$

où S est la sursaturation et v le volume moléculaire ; on obtient alors :

$$-\Delta G_v = \frac{2\gamma}{r} = \frac{kT \ln S}{v} \quad (I-50)$$

Par conséquent, l'enthalpie libre associée à la formation d'un germe de taille critique s s'exprime selon l'équation suivante :

$$\Delta G_{crit} = \frac{16\pi\gamma^3 v^2}{3(kT \ln S)^2} \quad (I-51)$$

qui, combinée à l'équation (I-48), permet de définir l'équation de la vitesse de nucléation suivante :

$$J = A \exp \left[\frac{16\pi\gamma^3 v^2}{3k^3 T^3 (\ln S)^2} \right] \quad (I-52)$$

Cette équation indique que trois principales variables gouvernent le taux de nucléation : la température T , la sursaturation S et la tension interfaciale γ .

I-5-5-1 La nucléation hétérogène

Le taux de nucléation d'une solution peut considérablement être affecté par la présence de particules étrangères dans la solution. Suivant les cas, une particule/surface étrangère peut agir comme inhibiteur ou accélérateur de nucléation.

Généralement, en présence d'une surface étrangère la barrière à franchir pour que la nucléation se produise se trouve globalement diminuée, l'enthalpie libre de surface ΔG_s étant diminuée. Contrairement à la nucléation homogène, dans le cas de la nucléation hétérogène les germes se forment à la surface d'un corps étranger.

Dans le cas de la germination hétérogène, le germe peut être assimilé à une sphère tronquée présentant un angle de mouillage θ formé avec la surface de la particule sur laquelle il nucléé. L'introduction d'un facteur d'efficacité de mouillage $f(\theta)$ dans l'équation (I-53) permet d'exprimer l'énergie libre associée :

$$\Delta G_{hét}^* = \Delta G_{hom}^* f(\theta) \quad (I-53)$$

La loi de Young-Dupré pour l'angle de contact permet alors d'écrire la relation entre les énergies libres critiques pour les nucléations primaire homogène et hétérogène en fonction de l'angle de mouillage :

$$\Delta G_{hét}^* = \Delta G_{hom}^* \frac{1}{4} (2 + \cos \theta)(1 - \cos \theta)^2 \quad (I-54)$$

Il n'existe actuellement pas de lois de nucléation spécifiques aux pyrophosphates de calcium.

I-5-5-2 La nucléation secondaire vraie

Cette nucléation étant induite par la présence de cristaux déjà présents en solution les théories et mécanismes mis en jeu se rapprochent de ceux de la nucléation primaire

homogène, à ceci près que les germes critiques sont générés au voisinage des cristaux parents et arrachés pour survivre en solution.

I-5-6 La croissance cristalline

I-5-6-1 Définition de la vitesse de croissance cristalline

La vitesse de croissance d'une face cristalline correspond à la vitesse d'avancement de cette face dans la direction qui lui est perpendiculaire (variation de longueur en fonction du temps). Les faces d'un cristal peuvent avoir des vitesses de croissance différentes, ce qui explique la diversité de forme de cristal obtenue.

En pratique la vitesse de croissance du cristal (et non plus d'une face) est couramment exprimée sous forme de croissance linéaire globale ($G = dL/dt$; L = dimension caractéristique du cristal) ou déterminée par la quantité de matière déposée par unité de surface et de temps (R_c en $\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$). Lors de l'étude cinétique à venir la définition utilisée sera cette dernière (R_c en $\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$).

I-5-6-2 Les mécanismes de croissance cristalline

Dès que des germes stables apparaissent dans un système sursaturé, ils continuent à croître en cristaux tant que la sursaturation persiste. Plusieurs modèles de croissance de faces cristallines existent mais le plus courant, utilisé à des fins de dimensionnement des installations, est fondé sur le transfert de matière du soluté vers la face cristalline par la théorie du double film. La théorie de la diffusion (théorie du double film) suppose que la matière est continuellement déposée sur la surface d'un cristal à une vitesse proportionnelle à la différence de concentration entre celle au point de dépôt et celle du volume de solution (Mullin, 2001). Ce modèle implique les deux processus majeurs suivants illustrés par la Figure I-25 :

- 1) Etape de diffusion et/ou convection : migration des espèces à la surface du cristal (1) ou transfert du soluté vers la surface du cristal (1)
- 2) Intégration du soluté au réseau cristallin (C)

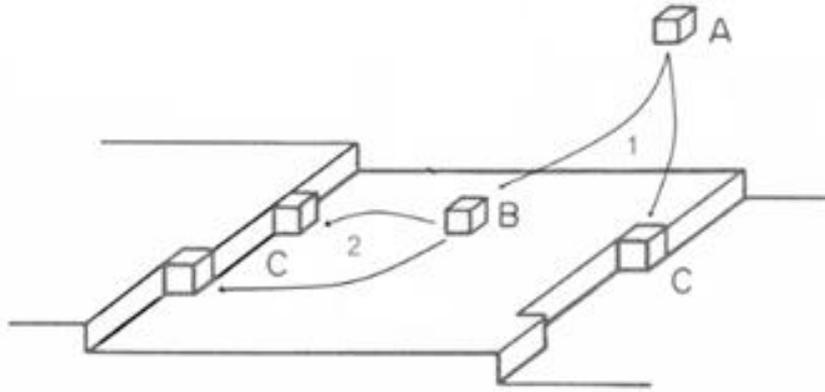


Figure I-25- Processus de croissance pour une unité de croissance cubique ; étape (1) Transfert du soluté vers la surface du cristal ; étape (2) Intégration du soluté au réseau cristallin

Chacune de ces deux étapes possède sa propre force motrice et la vitesse globale de croissance cristalline est limitée par le processus qui a la vitesse la plus faible au cours de ces deux étapes.

Les étapes de diffusion et d'intégration, sont décrites par les équations suivantes :

$$\frac{d_m}{dt} = k_d A (c - c_i) \text{ (Diffusion)} \quad (I-55)$$

et

$$\frac{d_m}{dt} = k_r A (c_i - c^*)^r \text{ (Intégration)} \quad (I-56)$$

où c_i est la concentration en soluté à l'interface cristal / solution, k_d et k_r les coefficients respectifs de diffusion et d'intégration, et A , la surface du cristal.

En pratique, les équations (I-55) et (I-56) ne sont pas faciles à appliquer car il est difficile de mesurer la concentration de soluté à l'interface solide / liquide c_i . Il convient alors d'éliminer le terme c_i en considérant la force motrice de diffusion comme la différence de concentration $(c - c^*)$ plus facilement mesurable. Une loi globale de croissance cristalline peut alors être écrite de la manière suivante :

$$\frac{d_m}{dt} = K_G A (c - c_i)^g \quad (I-57)$$

où :

- K_G = coefficient global de croissance cristalline
- g = ordre du processus de croissance cristalline

Pour $g = 1$, la concentration à l'interface c_i peut être éliminée et les équations (I-55) et (I-56) donnent alors :

$$\frac{d_m}{dt} = \frac{A(c - c_i)}{1/k_d + 1/k_r} \quad (I-58)$$

soit :

$$\frac{1}{K_G} = \frac{1}{k_d} + \frac{1}{k_r} \quad (I-59)$$

où :

$$K_G = \frac{k_d k_r}{k_d + k_r} \quad (I-60)$$

Pour les cas où l'intégration au réseau cristallin se fait très rapidement, *i.e.* pour de grands k_r , $K_G \approx k_d$ le processus de cristallisation est contrôlé par l'étape de diffusion. De la même manière, si l'intégration est plus lente que la diffusion $K_G \approx k_r$ alors le processus est contrôlé par l'étape d'intégration à la surface.

Le taux global de croissance massique R_G est défini comme le flux massique global vers la surface du cristal et s'écrit de la manière suivante :

$$R_G = \frac{1}{A_{ext}} \frac{dm}{dt} \quad (I-61)$$

Avec les équations (I-55), (I-56) et (I-57), on obtient :

$$R_{Gd} = k_d(c - c_i) \quad (\text{Diffusion}) \quad (I-62)$$

$$R_{Gr} = k_r(c_i - c^*)^r \quad (\text{Intégration}) \quad (I-63)$$

$$R_G = K_G(c - c_i)^g \quad (\text{Global}) \quad (I-64)$$

Le processus inverse de la dissolution peut être représenté par la relation :

$$R_D = K_D(c - c^*)^d \quad (I-65)$$

où d est généralement mais pas nécessairement égal à un.

De l'équation (I-62) on peut extraire la concentration à l'interface cristal / solution :

$$c_i = c - \frac{R_G}{k_d} \quad (I-66)$$

Ainsi l'équation (I-63) représentant l'étape d'intégration peut être écrite par l'équation suivante :

$$R_G = k_r \left(\Delta C - \frac{R_G}{k_d} \right)^r \quad (I-67)$$

où $\Delta c = c - c^*$ et $r \geq 1$.

Si $r = 1$ alors,

$$R_G = \left[\frac{k_d k_r}{k_d + k_r} \right] \Delta C \quad (I-68)$$

De manière générale et simplifiée, la vitesse de croissance d'un cristal peut s'exprimer, empiriquement, sous la forme :

$$R_c = k \cdot s(C - C_s)^n \quad (I-69)$$

où :

- k est la constante cinétique et dépend de la température suivant une loi de type Arrhenius

- C_s est la concentration à l'équilibre et C celle du soluté dans la solution
- s est proportionnel au nombre de sites de croissance actifs à la surface du cristal
- n est l'ordre global de la réaction et dépend du mécanisme prépondérant vis-à-vis de la croissance

Dans le cas d'ion électrolyte $A_m^{a+} B_n^{b-}$, les concentrations des espèces ioniques en solution et à l'équilibre dépendent des différents ions présents en solution. Afin de respecter l'électroneutralité au voisinage du cristal la relation suivante doit être observée :

$$m \cdot [A] = n \cdot [B] \quad (I-70)$$

La définition du produit ionique I est :

$$I = [A]^m \cdot [B]^n \quad (I-71)$$

La combinaison des équations (I-70) et (I-71) permet de déterminer les concentrations de A et B en fonction de I :

$$[A] = (\beta/m)^{n/v} \cdot I^{1/v} \text{ et } [B] = (m/n)^{m/v} \cdot I^{1/v} \quad (I-72)$$

où v représente le nombre d'ions dans les formules chimiques.

Les concentrations des espèces ioniques A et B en solution sont proportionnelles à $I^{1/v}$, ce qui signifie qu'à l'équilibre de solubilité, elles sont proportionnelles à $K_s^{1/v}$ et l'équation (I-69) devient alors :

$$Rc = ks \cdot (I^{1/v} - K_s^{1/v})^n \quad (I-73)$$

D'après la définition du rapport de sursaturation relative σ donnée par l'équation (I-5), l'expression de la vitesse de croissance peut donc s'écrire :

$$Rc = ks \cdot \sigma^n \quad (I-74)$$

L'expression (I-74) a été utilisée par de nombreux auteurs (Nielsen, 1984), (Nancollas and Purdie, 1964). La valeur de n varie essentiellement entre 1 et 4. Lorsque $n = 1$ c'est la diffusion dans la solution qui est le phénomène contrôlant la vitesse, lorsque $n = 2$ il s'agit

d'un mécanisme de croissance en spirale et enfin lorsque n est supérieur à 2 le phénomène de polynucléation à la surface du cristal prévaut.

Il existe aussi le cas où $n > 1$ qui correspond à une variante du mécanisme d'ordre 1 contrôlé par la diffusion pour lequel on observe une déviation de la valeur de n (Schierholtz, 1958) due à une concentration non uniforme du soluté (Humphreys-Owen, 1949), (Amelinckx, 1950) à la surface des faces des cristaux qui croissent. Il s'agit d'un mécanisme de croissance majoritairement contrôlé par la diffusion en surface plus que par la diffusion en solution (O'Rourke and Johnson, 1955).

Déterminer l'ordre de l'expression de la vitesse de croissance R_c sous la forme de l'équation (I-74) d'un cristal en fonction de la sursaturation relative σ de celui-ci peut donc permettre de déterminer à quel mécanisme de croissance obéit ce cristal. Nous procéderons de cette manière au chapitre III pour identifier les mécanismes de croissance des CPPD avant d'étudier leur croissance en présence d'additif.

Peu de travaux sur les cinétiques de croissance ou dissolution des pyrophosphates de calcium ont été réalisés auparavant. Christoffersen *et al.* (Christoffersen et al., 1999) ont déterminé lors d'une étude *in vitro* la vitesse de dissolution du t-CPPD. Ils ont identifié un mécanisme polynucléaire de dissolution, dans lequel de petits trous de taille critique se propagent et grandissent à la surface du cristal, avec une vitesse dépendant principalement de la concentration en ions calcium. D'après eux cela pourrait expliquer la vitesse observée. Les résultats ont conduit à l'obtention d'une valeur d'environ 30 mJ.m^{-2} pour l'énergie de surface du t-CPPD. De plus cette étude a aussi montré que le processus de dissolution observé n'est pas seulement limité par un phénomène polynucléaire de surface, mais est également légèrement influencé par le transport de substances loin de la surface du cristal. Christoffersen *et al.* (Christoffersen et al., 2000) ont également déterminé les vitesses de formation et de croissance d'une phase de pyrophosphate de calcium tétrahydraté m-CPPT β , qui est un précurseur de la phase t-CPPD. Cette phase présente un phénomène intéressant lors de sa formation et croissance à pH 7. Le taux de croissance est de plus en plus inhibé avec l'augmentation de la sursaturation. Le temps induction lors de sa précipitation spontanée est plus long à pH 7 qu'à pH 5 pour une sursaturation donnée. Les auteurs ont supposé que cette « auto-inhibition » est due à la chélation d'ions Ca^{2+} et $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ à la surface du cristal bloquant le processus de croissance et ainsi la croissance normale du m-CPPT β . Et enfin

Christoffersen *et al.* (Christoffersen et al., 2001) ont étudié le taux de croissance du t-CPPD en fonction du pH et pour des sursaturations comprises entre 3 et 7 lors d'expériences à composition non constante ou le pH est maintenu constant via l'ajout d'une solution titrante de KOH. Lors de ces études la vitesse de croissance des phases m-CPPT β et t-CPPD a été déterminée à partir du taux de croissance $J = dn_{\text{CPP}}/dt$ à l'aide de l'expression suivante :

$$J = k_j m_0 F(m/m_0) g(C) \quad (I-75)$$

avec :

- k_j une constante proportionnelle à la surface spécifique initiale
- m_0 la masse initiale du cristal
- $F(m/m_0)$ une fonction représentant le changement du rapport morphologie/surface du cristal
- $g(C)$ une fonction de la composition de la solution (Christoffersen, 1980)

Les résultats de cette étude suggèrent que pour élucider le comportement cinétique des cristaux de CPPD *in vivo* et *in vitro*, la formation, la croissance et les processus de dissolution doivent être décrits en termes phénomène de surface (interactions moléculaires) entre la surface des cristaux de CPPD et les fluides corporels pertinents. Cette description est nécessaire pour comprendre les processus impliqués *in vivo* et donc pour prédire les méthodes possibles de prévention et de traitement de la maladie à cristaux de CPPD.

La piste alors soulevée par Christoffersen *et al.* (Christoffersen et al., 2001) suggère que l'étude de l'influence d'ions et molécules faisant office d'additifs, notamment ceux naturellement présents dans le milieu articulaire arthrosique, est particulièrement important pour la compréhension des maladies à cristaux de CPPD et la mise au point d'un traitement thérapeutique à moyen-long terme.

La partie suivante traitera donc naturellement de l'influence d'additifs en précipitation et notamment du choix des additifs qui sera fait pour notre étude.

I-6 Influence d'additifs en précipitation

Dans le vocabulaire de la croissance cristalline en solution, les termes impuretés et additifs occupent une très grande place. Le premier concerne des substances étrangères qui se trouvent naturellement dans le système alors que le second s'applique plutôt à des substances

étrangères que l'on ajoute volontairement à la solution (Boistelle, 1985). Dans les deux cas, il s'agit de composés présents durant la cristallisation dont on doit subir l'influence ou dont on veut tirer profit. L'utilisation d'additifs en cristallisation permet un meilleur contrôle des cinétiques de nucléation mais aussi de croissance. Contrôler la nucléation revient généralement à diminuer le nombre de cristaux afin d'obtenir des cristaux plus gros ayant sensiblement la même taille. Contrôler la croissance consiste également à la ralentir en général, et surtout sélectivement, l'avancement de certaines faces. Les cristaux auront des faciès différents donnant lieu à de meilleures propriétés d'usage.

I-6-1 Classification des additifs

Les additifs employés pour les solutions aqueuses peuvent être divisés en plusieurs groupes selon Nývlt et Ulrich (Nývlt and Ulrich, 2008) :

- Les acides libres et/ou les bases

Ils agissent en ajustant la valeur du pH de la solution. Le pH modifie la nature et la concentration des ions en solution et plus particulièrement lorsque cette dernière contient des sels d'acides faibles ou de bases. Cette valeur de pH a un effet considérable sur la forme ou la taille des cristaux produits et affecte également le taux de croissance. Les acides ou bases les plus souvent utilisés ont généralement un ion en commun avec la substance qui cristallise.

- Les additifs inorganiques

Il s'agit par exemple d'ions comme les cations tels que Fe^{3+} , Cr^{3+} , Al^{3+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , ainsi que certains anions tels que WO_4^{2-} , MoO_4^{2-} , PO_4^{3-} . De très faibles concentrations de ces additifs sont souvent suffisantes pour présenter un effet considérable sur la cristallisation (de 0,001 à 0,1% en masse). Afin d'obtenir un effet similaire avec des additifs moins actifs, des concentrations plus élevées doivent être utilisées (de 1 à 10% en masse). Certains d'entre eux comme Cr^{3+} et Fe^{3+} , exercent parfois un fort effet inhibiteur de nucléation. En général, le comportement suivant a été constaté : plus la charge du cation est importante et plus l'effet inhibiteur est fort ($\text{Cr}^{3+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Na}^+$) (Mullin, 2001).

- Les additifs organiques (les plus fréquemment utilisés)

Présentant une efficacité élevée, les additifs organiques les plus fréquemment utilisés sont des substances tensio-actives et des matières colorantes organiques. Il a été observé

qu'une seule molécule d'un tel additif suffit à diminuer le taux de croissance de 10^4 à 10^6 molécules d'un composé organique. Cette propriété peut être attribuée au fait que les grosses molécules organiques peuvent être adsorbées sur n'importe quel site à la surface d'un cristal ce qui fait de leur taille un paramètre prépondérant sur le taux de croissance du cristal.

- ***Les additifs "Tailor-made" / Approche cristallographique***

La notion d'additif "fait sur mesure" appelés additifs "Tailor-made" (Weissbuch et al., 2003) fut introduite en 1985 par l'équipe du Weizmann Institute (Berkovitch-Yellin et al., 1985) qui a alors décrit une technique pour contrôler et modifier la morphologie de cristaux organiques. Cette approche structurale permet de choisir ou de synthétiser un additif capable d'agir de manière efficace à partir de la connaissance de la structure du soluté. Elle se base sur le fait que la croissance des différentes faces d'un cristal est déterminée par des interactions intermoléculaires entre les molécules du cristal et des paramètres extérieurs tels que le solvant par exemple. Une analyse des orientations moléculaires dans le cristal est faite au préalable pour choisir un composé qui formera de façon préférentielle des liaisons avec des molécules du cristal en particulier. L'énergie potentielle des liaisons espérées est calculée au préalable. Cette méthode se base sur des prédictions de formation de liaisons d'où l'appellation « sur mesure ».

Elle a été décrite comme adaptée aux cristaux organiques. Cependant en se basant sur ces principes, Black *et al.* (Black et al., 1991) sont parvenu à utiliser des interactions à l'interface organique / inorganique permettant la formation de liaisons pour phosphonates à la surface de cristaux de barytine aboutissant ainsi à un changement de morphologie pour ces derniers (Amathieu et Boistelle, 1986).

La manière de procéder dans cette étude pourrait être intéressante pour faire les choix d'additifs à étudier au cours de cette thèse puisque le système d'intérêt dans lequel se trouvent les cristaux de CPP inorganique qu'est le corps humain, est un système pour lequel les interactions avec des molécules organiques sont nombreuses. Utiliser une telle approche structurale pourrait notamment s'apparenter à choisir des additifs présentant une ressemblance chimique avec les ions pyrophosphates ou orthophosphates ou présentant des structures cristallographiques proches ou analogues à celles des CPP. Ces additifs pourraient alors former de façon préférentielle des liaisons avec une face du cristal en particulier. De tels additifs dont certains seront choisis pour l'étude à venir sont présentés dans le paragraphe qui suit.

- *Classement des additifs pour les CPP*

Dans cette étude, nous nous intéressons à des additifs biocompatibles. Il a déjà été démontré que l'ion magnésium influence la formation des CPPD (Cheng and Pritzker, 1981) lorsque qu'il est présent lors de sa formation. Cette première observation laisse supposer qu'un potentiel d'excès en certains ions dans les articulations arthrosiques pourrait être précurseur et/ou un facteur aggravant de la formation de cristaux de CPPD ainsi que de la réponse inflammatoire qui s'en suit. Pour explorer cette hypothèse, il pourrait être intéressant de mettre en corrélation des analyses médicales de compositions de fluides ostéoarticulaires chez des patients arthrosiques souffrant également de maladies causées par un déséquilibre ionique, tels que les maladies de Menkès et Wilson dues à des taux de cuivre anormaux dans le corps (McClure and Smith, 1983) avec une étude de l'influence de cations initialement présents dans le corps humain et/ou impliqués dans d'autres maladies. Notons que des cations notamment divalents naturellement présents dans le corps humain, tels que Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} et Fe^{3+} peuvent cristalliser *in vitro* sous forme de pyrophosphate (Effenberger, 1990), (Oka and Kawahara, 1982), (Calvo, 1965), (Giesber et al., 2000), présentant des structures cristallographiques proches ou analogues à celles des CPP pouvant laisser espérer de potentielles substitutions lors de la cristallisation des CPP en leur présence par exemple. Si ces ions ont effectivement une influence sur la formation des CPPD leur étude pourrait tout d'abord permettre d'obtenir des informations sur la raison, l'ordre d'apparition et l'évolution de ces cristaux et ainsi donner des pistes de traitements des maladies dus à des microcalcifications de CPPD.

Hormis les ions inorganiques initialement présents dans le corps humain, d'autres types de composés peuvent être considérés comme additifs potentiels dans la mise au point d'un traitement. Des molécules ayant déjà fait leur preuve dans la mise en œuvre de traitements thérapeutiques plus ou moins expérimentaux et/ou pouvant potentiellement interagir avec des pyrophosphates de calcium.

Il peut donc s'agir de composés présentant une ressemblance chimique avec les ions pyrophosphate ou orthophosphate tels que les phosphocitrates (Nair et al., 1997) et des acides phosphoniques comme les bisphosphonates (Russell and Rogers, 1999), (Rondeau et al., 2006) ou diphosphonates (Francis et al., 1969). Les bisphosphonates sont d'ailleurs utilisés pour soigner l'ostéoporose et leur influence sur la formation des CPPD a déjà été étudiée par Christoffersen et Christoffersen (Christoffersen and Christoffersen, 2003). Il est ressorti de leur étude que ces derniers inhibent la croissance ou retardent la formation des phases t-CPPD

et m-CPPT β . Francis *et al.* (Francis et al., 1969) ont quant à eux montré que les diphosphonates inhibent la cristallisation de phosphates de calcium *in vitro* et préviennent la formation de calcifications aortiques lorsque leur action est combinée à l'ingestion de fortes doses de vitamine D₃ chez les rats.

Il peut aussi s'agir de protéines d'intérêt biologique connues comme l'ostéopontine (Rosenthal et al., 2007) et la fétuine A qui d'après de précédentes études (Shroff et al., 2008) semblent avoir un effet inhibiteur sur le développement de calcifications ectopiques dans l'environnement urémique pro-calcification et pro-inflammatoire chez les enfants dialysés souffrant de maladies chroniques des reins aussi à l'origine de calcifications vasculaires.

Ces différents additifs potentiels pourraient agir selon les modes d'action décrits au paragraphe précédent. Ceci peut être facilité lorsqu'il existe une ressemblance de structure ionique ou moléculaire entre l'additif et les ions ou molécules constituant le cristal. Ces facteurs sont très souvent pris en compte puisqu'efficaces pour choisir des additifs selon la méthode utilisant des additifs de type « taylor-made » décrite précédemment. C'est d'ailleurs dans ce but que Rondeau *et al.* (Rondeau et al., 2006) ont étudié la structure de la farnésyle pyrophosphate synthase humaine complexée avec des bisphosphonates pour montrer son aptitude à interagir les tumeurs des tissus, afin de faciliter la conception de médicaments anti-protozoaires plus puissants et spécifiques en se basant sur la structure identifiée.

Suite à toutes ces considérations nous avons procédé au classement suivant (Tableau I-14) des additifs potentiels à éventuellement tester sur la formation des CPP d'intérêt biologique. Nous avons choisi d'étudier l'influence des additifs ioniques présents dans le corps humain (2^{ème} colonne ; Tableau I-14) ainsi que l'ion thiosulfate, non présent *in vivo*, (Adirekkiat et al., 2010) dont les effets sur la formation des CPPD n'ont encore jamais été déterminés excepté pour l'ion Mg²⁺ (Cheng and Pritzker, 1981).

Tableau I-14- Classement non exhaustif des additifs pouvant potentiellement agir sur la cristallisation et la dissolution des pyrophosphates de calcium.

Additifs ayant une ressemblance chimique avec les ions pyrophosphate ou orthophosphate	Additifs ioniques cristallisant dans des structures cristallographiques similaires ou proches de celles des CPP	Protéines
<ul style="list-style-type: none"> • Phosphocitrate * (Nair <i>et al.</i>, 1997) • Bisphosphonate * (Russell and Rogers, 1999) • Thiosulfate 	<ul style="list-style-type: none"> • Mg²⁺ ** • Zn²⁺ • Cu²⁺ • Fe²⁺ • Fe³⁺ 	<ul style="list-style-type: none"> • Fétuine A (Stenvinkel <i>et al.</i>, 2005) • Ostéopontine (Rosenthal <i>et al.</i>, 2007) 
*Testé sur la cristallisation des CPP	*Testé sur la dissolution des CPP en présence or non de phosphatase alcaline + polyamines (T. Shinozaki <i>et al.</i> , 1995)	

I-6-2 Mécanismes d'action des additifs

De nombreux additifs opèrent probablement avec des mécanismes différents et tous les paramètres de cristallisation (solubilité, nucléation et croissance) peuvent être influencés par la présence d'additifs dans une solution. Certains additifs sont adsorbés de façon sélective sur les faces du cristal et d'autres incorporés au réseau cristallin ou repoussés par la croissance du cristal. La formation de solution solide peut parfois être observée et il existe aussi des interactions chimiques entre additifs et cristaux.

Théoriquement, on pourrait s'attendre à ce que, dans certains cas, les cinétiques de croissance ou de nucléation augmentent puisque l'additif agit par adsorption et que toute adsorption résulte en une diminution des énergies interfaciales. Il s'agirait là d'un effet purement thermodynamique. On peut préciser encore que l'adsorption est, dans la plupart des cas, temporaire et réversible. En réalité, le blocage des germes est toujours suffisamment efficace pour que l'effet cinétique soit bien plus important que l'effet thermodynamique.

Par ailleurs, on sait que la croissance des cristaux, donc des germes, se fait seulement par l'intermédiaire de quelques sites dits de croissance (coins, marches,...). Il suffit donc d'une quantité infime d'impuretés ou d'additifs pour bloquer tous ces sites et retarder voire empêcher la nucléation puis la croissance (Downey *et al.*, 1992). De plus, un additif qui retarde efficacement la croissance des cristaux, en retarde également la dissolution (Boistelle, 1985). Les additifs affectent donc tous les stades de la cristallisation.

De manière très générale, il faut noter encore que les additifs perdent de leur efficacité lorsque la sursaturation augmente. Ceci se conçoit aisément, car, si le germe pousse très vite, l'additif n'a pas le temps de s'adsorber.

Des modèles cinétiques, basés sur des mécanismes d'action des additifs sur la croissance ont été décrits grâce à des approches phénoménologiques (Kern, 1968).

Les inhomogénéités atomiques à la surface d'un cristal ont un impact sur les taux de croissance. Selon Kossel et Stranski, on peut distinguer trois régions différentes à la surface d'un cristal (coins, marches et terrasses), représentées sur la Figure I-26. Il s'agit des positions les plus favorables à l'adsorption de soluté à cause de leurs hautes énergies de liaison. Les surfaces planes sont les sites les moins intéressants d'un point de vue énergétique pour une possible adsorption. Néanmoins, selon leur nature les additifs peuvent s'adsorber sur différents sites à la surface d'un cristal : ils peuvent affecter l'énergie interfaciale des différentes faces ou bloquer les centres de croissance. Les additifs peuvent avoir des effets différents selon les sites sur lesquels ils sont adsorbés.

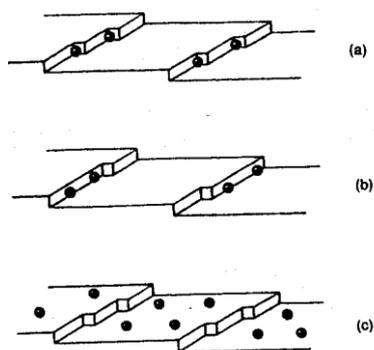


Figure I-26-Sites pour l'adsorption d'additifs lors de la croissance cristalline basés sur le modèle de Kossel : (a) coins; (b) marches ; (c) terrasses (Nyvlt and Ulrich, 2008).

La notion d'adsorption peut être expliquée par différentes voies d'approche théorique : moléculaire (dynamique moléculaire, physico-chimie quantique (DFT)), statistique (physique statistique), milieu continu (thermodynamique «classique»). Celle qui va nous intéresser ici est l'approche thermodynamique classique où l'adsorbé est considéré comme une phase, donc un milieu continu, macroscopique, avec des caractéristiques moyennes de type P, V, T et c. La démarche de cette approche consiste à établir des relations d'équilibre entre ces grandeurs, notamment entre les concentrations en phase adsorbée et celles du fluide. Soit un ensemble de relations empiriques reliant les concentrations de deux phases à P et T données :

$$q_i = q_i(c_1, c_1, c_n) ; i = 1 \dots n \quad (I-76)$$

Une condition suffisante est que l'équilibre résulte de l'égalité de potentiels dérivés de fonctions d'état thermodynamiques des phases :

$$\left(\frac{\partial G_A}{\partial n_i}\right)_{T,P,n_j} = \left(\frac{\partial G_B}{\partial n_i}\right)_{T,P,n_j} ; G \text{ convexe et homogène en } n_i \quad (I-77)$$

Avec G l'enthalpie libre de la phase considérée

Ce type de raisonnement peut par exemple conduire à la construction d'isothermes à partir de modèles thermodynamiques :

$$G = G^{ideal} + G^{excès} = \sum \mu_i n_i = \sum n_i (\mu^0 + RT \ln x_i) + G^{excès} \quad (I-78)$$

Une condition suffisante est que la loi d'équilibre dérive de l'égalité de potentiels chimiques, eux-mêmes dérivés d'un modèle d'énergie de Gibbs des phases. Lorsque nous sommes en présence de telles relations il est possible d'utiliser des méthodes expérimentales pour en déterminer les termes et évaluer alors l'adsorption d'un composé sur un autre.

La notion d'adsorption préférentielle dans les sites de pas répétable fut introduite en 1954 par Bliznakov (Bliznakov, 1954). Selon les équations de taux de croissance et en considérant que l'adsorption abaisse l'énergie de surface et la taille critique des germes, le résultat attendu pour une adsorption est une augmentation du taux de croissance des cristaux. Cependant il n'existe qu'un exemple où l'adsorption d'un additif sur les marches du cristal diminue l'énergie libre totale (γ) augmentant alors la vitesse de croissance. Ce cas est celui de la face (100) du triphosphate de sodium hexahydraté évoqué par Troost (Troost, 1968) mais jamais reproduit.

D'autres paramètres doivent alors agir dans la direction opposée afin d'expliquer la diminution des taux de croissance généralement observée lors de phénomènes de changement de morphologie, comme le ralentissement du flux vers les marches ou la diminution de nombre de coins disponibles pour la croissance.

Cabrera et Vermilya proposèrent en 1958 le modèle de gradin filtrant (Cabrera and Vermilyea, 1958), repris par Chernov en 1961 (Chernov 1961). Ces auteurs ont décrit l'influence que peut avoir un additif sur l'avancée de la marche en s'adsorbant à la surface

d'un cristal (Figure I-27). Les additifs étant adsorbés à la surface, ils restent fixes ce qui impose à la marche qui avance de s'incurver entre deux molécules. Le rayon de courbure de la marche est modifié, il devient alors inférieur au rayon originel. Pour continuer à croître une augmentation de la sursaturation du milieu ambiant est nécessaire afin de compenser la diminution du rayon du germe. Cela signifie que la sursaturation nécessaire à la croissance est supérieure à celle prédite par l'équation de Gibbs-Thomson ainsi la face aura donc une vitesse de croissance inférieure à celle qu'elle aurait eu dans un milieu pur et possèdera une zone appelée zone morte pour laquelle il n'y aura pas de croissance.

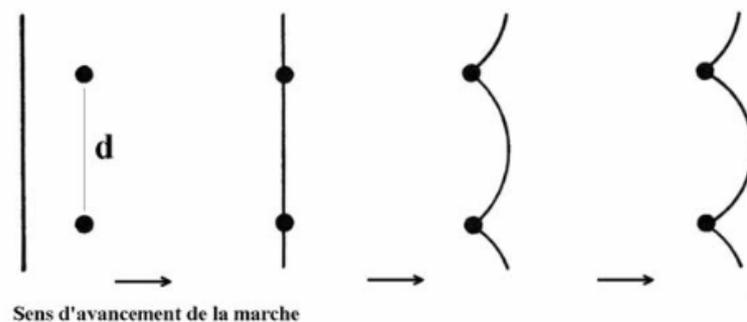


Figure I-27 - Modèle du gradin filtrant. Les points noirs représentent les additifs adsorbés sur les terrasses. L'avancement de la marche est ralenti, elle s'incurve (Taulelle, 2007).

Ces différentes manières d'agir peuvent parfois entraîner une modification de la structure cristalline ainsi que changer la morphologie et le faciès cristallin. De plus des différences de taille et faciès peuvent permettre de remonter à des informations telles que les mécanismes de croissance pouvant être modifiés par la présence d'additifs mais aussi influencer les réactivités de surface, et donc les phénomènes de dissolution/croissance ou le potentiel inflammatoire de chaque face. Roche-Arveiller *et al.* (Roche-Arveiller et al., 1990) ont montré qu'un faciès aciculaire est plus inflammatoire qu'un faciès cubique ce qui peut expliquer les différences de propriété phlogogène observé pour les différentes phases de CPP.

La cinétique de dissolution et la solubilité d'un cristal peuvent être modifiées par l'utilisation d'additifs. Une modification dans la cinétique de transition de l'irbesartan de sa phase A vers sa phase B en présence d'acide adipique et de chlorure de dodécyl ammonium a été observée par Garcia (Garcia, 2000). Cet exemple est d'autant plus intéressant qu'il fait intervenir des variétés polymorphes. Contrairement au CPPD il s'agit d'un exemple de cristal organique mais nous verrons plus loin avec l'étude de Black *et al.* (Black et al., 1991) utilisant

des interactions à l'interface organique / inorganique et permettant la formation de liaisons pour phosphonates à la surface de cristaux de barytine, que même pour des cristaux inorganiques les modèles établis à partir de cristaux organiques peuvent s'appliquer. La purification d'un conglomerat par dissolution sélective puis recristallisation en utilisant la modification de la cinétique de dissolution d'un énantiomère de l'hydrochlorure de méthionine a été étudiée par Zbaida *et al.* (Zbaida et al., 2000).

L'action d'un additif sur la nucléation peut se traduire de différentes manières comme la cristallisation préférentielle d'une phase métastable ou l'inhibition de la cristallisation. De nombreuses études ont par exemple montré que le magnésium est un inhibiteur de la cristallisation de la calcite (CaCO_3). Bischoff a montré que l'ion Mg^{2+} agit en s'incorporant dans la structure de la calcite durant sa formation (Bischoff, 1968). Reddy et Nancollas ont observé des précipités formés en présence de 10^{-3}M d'ions magnésium qui ont permis d'établir que la formation de carbonate de calcium comprend une phase instable amorphe subissant des transformations successives en aragonite puis calcite (Reddy and Nancollas, 1976).

Un des effets les plus utilisés est l'emploi d'additifs comme modificateur de croissance. L'influence de la distance entre les groupements hydroxyle d'acides carboxyliques sur la croissance de la gibbsite a par exemple été étudiée par Seyssiecq *et al.* (Seyssiecq et al., 1999). Gutjahr *et al.* (Gutjahr et al., 1996) ont montré l'influence des cations divalents Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} et Ba^{2+} sur les taux de croissance et de dissolution de la calcite et de l'aragonite. Dans la plupart des cas, les résultats peuvent être interprétés comme une adsorption réversible des ions sur les sites appelés coins selon le modèle de Langmuir-Volmer. Les ions des métaux de transition présentent un effet d'inhibition plus fort que les ions alcalino-terreux. Mg^{2+} et Fe^{2+} n'ont pas d'influence sur la croissance et la dissolution de l'aragonite. En outre, Cu^{2+} et Zn^{2+} ont un effet plus important sur la calcite, tandis que Sr^{2+} et Ba^{2+} sont plus efficaces sur l'aragonite. Ces résultats montrent les conséquences de la présence d'additifs sur la précipitation des différentes variétés polymorphes de CaCO_3 .

Dans le cas des phosphates de calcium plusieurs inhibiteurs de formation ont été identifiés et étudiés. C'est notamment le cas de la fétuine, des polyphosphonates, polyphosphates (Francis, 1969), et pyrophosphates (Cheng and Pritzker, 1983), (Fleisch and Bisaz, 1962) ainsi que du magnésium qui inhibent la formation d'hydroxyapatite de calcium.

Les phosphonates (Fleisch et al., 1970) tels que les disphosphonates (Francis et al., 1969) et bisphosphonates de type alendronate et ibandronate (Price et al., 2001) inhibent la formation *in vitro* des cristaux de phosphates de calcium impliqués dans des pathologies avec calcifications et préviennent la formation de calcification aortique. Price *et al.* ont établi l'hypothèse selon laquelle ces bisphosphonates peuvent agir en inhibant l'activité des cellules vasculaires. Dans ce cas, l'action de l'additif ne touche a priori pas directement les mécanismes de formation des phosphates de calcium mais plutôt le milieu biologique (action sur les cellules du tissu). C'est aussi le cas des phosphocitrates (Cheung et al., 1996) qui inhibent la mitogenèse (prolifération cellulaire par division cellulaire) induite par les cristaux d'orthophosphate de calcium et de pyrophosphate de calcium. Cependant l'action des tels additifs sur diverses activités cellulaires et/ou enzymatiques n'a pas permis de mettre au point un traitement efficace pour l'arthrose dans laquelle ortho- et pyrophosphates de calcium sont impliqués. C'est pourquoi, l'exploration des phénomènes physico-chimiques en complément aux études biologiques existantes constitue une piste intéressante pouvant expliquer les causes et/ou mécanismes contribuant à favoriser l'aggravation de la maladie.

Notons aussi que parfois une molécule peut jouer un rôle d'additif vis-à-vis d'elle-même et modifier sa propre cristallisation. C'est le cas de l' α -glycine qui inhibe sa propre nucléation lorsque sa concentration augmente. Ce phénomène est appelé « self poisoning » soit auto-empoisonnement.

I-6-3 Effet d'additifs sur la cristallisation de pyrophosphates de calcium

Très peu d'études ont été réalisées sur la cristallisation et la dissolution des pyrophosphates de calcium que ce soit en présence ou non d'additifs. Les quelques études menées entre les années 1995 et 2003 sont abordées dans cette partie.

- Le cation Mg^{2+}

Cheng et Pritzker (Cheng and Pritzker, 1983) ont montré que l'ion magnésium favorise l'obtention de cristaux de la phase m-CPPD plutôt que t-CPPD lors d'une étude faisant varier simultanément les concentrations en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} lors de la synthèse de CPP. Il semblerait que la formation de cristaux de CPPD pourrait être initiée dans le cartilage avec une concentration « normale » en ions calcium dans le liquide synovial ($[Ca^{2+}] = 0,5$ à $2,4$ mM), une élévation de la concentration en pyrophosphate, et/ou une diminution de la

concentration en ions Mg^{2+} . Ce résultat a été obtenu lors d'une étude au cours de laquelle les auteurs ont étudié en solution aqueuse à 37°C, pH 7,4 et $[Na^+] = 140$ mM, l'influence de la concentration en ions calcium, magnésium et pyrophosphate sur la formation de cristaux de CPP en solution aqueuse dont quelques résultats remarquables sont présentés sur la Figure I-28. Cette figure illustre les conditions d'obtention des phases de cristaux à partir d'une solution aqueuse de $CaCl_2/MgCl_2$ et 0,05 mM $Na_4P_2O_7$ (a) ou 0,50 mM $Na_4P_2O_7$ (b) à pH 7,4, 37°C et $[Na^+] = 140$ mM. On note que les zones d'obtention de CPP correspondent à un très grand nombre de couples $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$ lorsque la concentration en pyrophosphate augmente (Figure I-28 ; a et b). A faible concentration en pyrophosphate, la diminution de la concentration en ions Mg^{2+} promeut la formation de CPP (Figure I-28 ; a). Et enfin quelle que soit la concentration en pyrophosphate l'augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} favorise l'obtention de CPP.

Les auteurs ont réalisé leurs essais avec trois concentrations différentes de pyrophosphate de sodium afin d'obtenir un précipité de pyrophosphate de calcium en quantité suffisante pour être analysé. Pour cette étude, les conditions de synthèse n'ont donc pas été spécifiquement contrôlées pour la précipitation d'une phase de CPP en particulier. De ce fait, à partir de ces travaux, nous ne sommes pas en mesure de déterminer sur quelle(s) phase(s) l'ion Mg^{2+} a agi. Le mécanisme d'action avec lequel l'ion Mg^{2+} a influencé la cristallisation des CPPD n'a pas été déterminé. Il s'agit donc d'un point qui sera repris et approfondi lors de cette thèse.

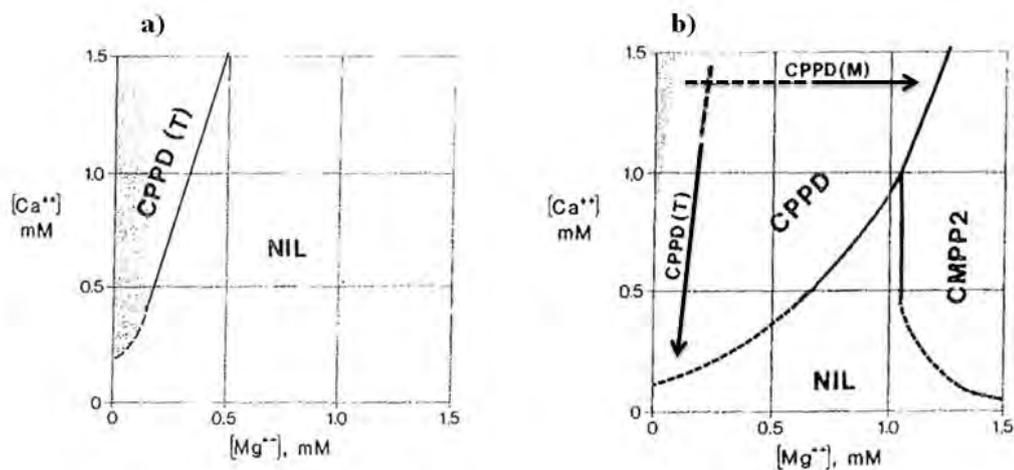


Figure I-28- Résumé graphique des phases de cristaux obtenus dans une solution aqueuse de $CaCl_2/MgCl_2$ et 0,05 mM $Na_4P_2O_7$ (a) ou 0,50 mM $Na_4P_2O_7$ (b) à pH 7,4, 37°C et $[Na^+] = 140$ mM. Les flèches indiquent l'augmentation de la quantité d'un cristal en particulier. (Cheng and Pritzker, 1981) ; NIL signifie nothing (pas de formation de CPP) ; CMPP2 signifie pyrophosphate mixte de calcium et demagnésium.

- **Polyamine, cations Mg^{2+} et Ca^{2+}**

La phosphatase alcaline (ALP) est une enzyme avec une activité pyrophosphatase capable de dissoudre des cristaux de pyrophosphates de calcium dihydratés (CPPD) via leur activité d'hydrolyse des liaisons P-O-P (groupements pyrophosphate) en orthophosphate (Figure I-29). Shinozaki *et al.* (Shinozaki and Pritzker, 1995), (Shinozaki et al., 1995), (Shinozaki and Pritzker, 1996) ont étudié l'activité de dissolution des CPPD en présence de polyamine, substrat connu pour améliorer l'activité de l'ALP.

Pyrophosphatase

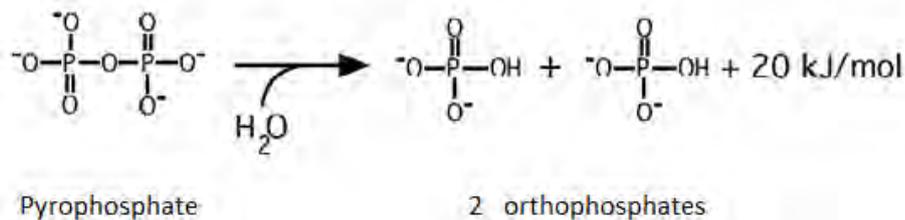


Figure I-29-Réaction d'hydrolyse des groupements pyrophosphate notamment de l'adénosine triphosphate en groupements orthophosphate (adénosine monophosphate) montrant l'action de l'enzyme pyrophosphatase

Ils ont utilisé un modèle *in vitro* pour des interactions cristaux-enzymes qui a été utilisé pour évaluer la dissolution de CPPD d'un point de vue aussi bien biologique, chimique que morphologique.

Au terme de cette étude, il a été démontré biochimiquement et morphologiquement que des polyamines telles que la spermidine peuvent améliorer l'activité de l'ALP pour dissoudre des cristaux de CPPD. Cette activité de dissolution est exacerbée en présence d'ion Mg^{2+} et inhibée en présence d'ion Ca^{2+} (Figure I-30). Il a été aussi démontré que la polyamine améliore la dissolution des CPPD de manière stéréosélective sur les petites faces du cristal (plans 010) (Figure I-31), indiquées par la présence de petits « puits gravés » dans le cristal (Shinozaki and Pritzker, 1995)(Shinozaki et al., 1995). Ceci suggère que le taux de dissolution des cristaux de CPPD est limité par la disponibilité des faces susceptibles de se lier à l'ALP.

Cette étude suggère aussi que la polyamine et l'ALP ont un effet synergique sur l'activité de l'ALP lorsqu'elle est requise pour le métabolisme énergétique intracellulaire.

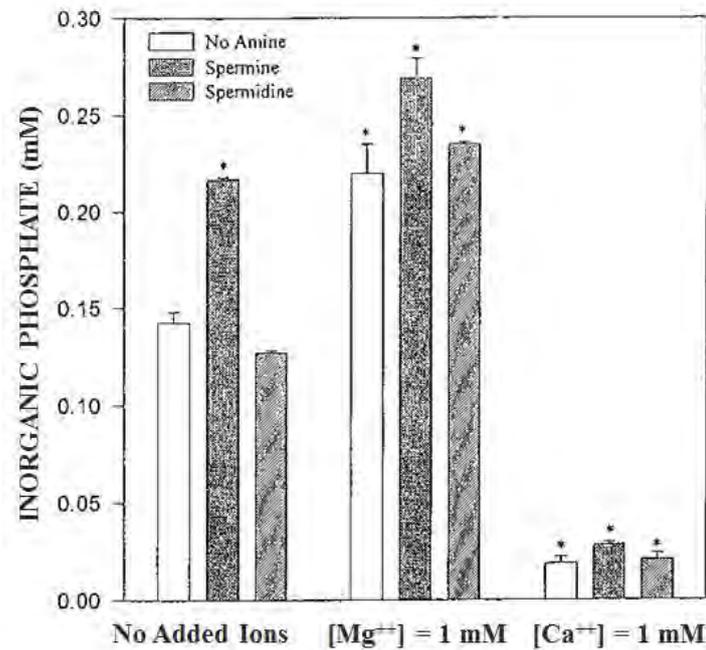


Figure I-30-Effet combiné de deux types de polyamine et d'ions sur la dissolution de cristaux de CPPD ; 2,5 g de cristaux de t-CPPD ont été incubés avec 10 U d'ALP dans une solution tampon à pH 7,4 contenant 0,1 M de Tris-HCl et 1 mM de spermine ou la combinaison de polyamine et 1 mM de [Mg²⁺] ou polyamine et 1 mM de [Ca²⁺], à 37°C pendant 72 heures (Shinozaki and Pritzker, 1995).

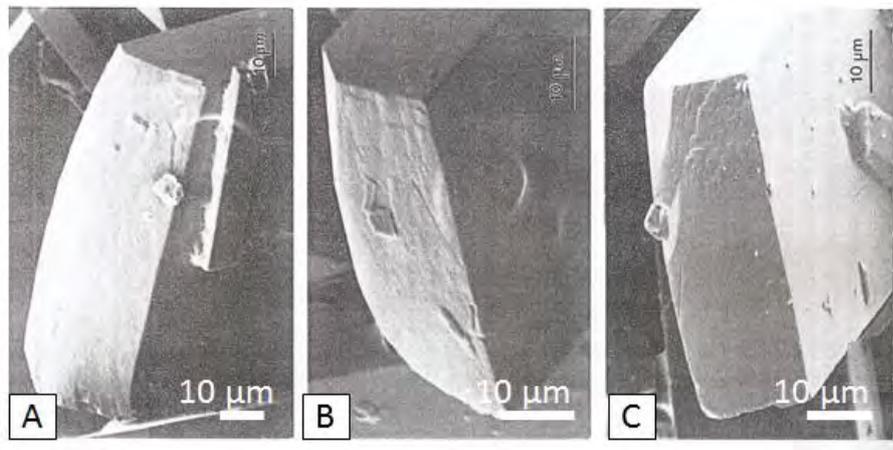


Figure I-31-Image MEB de cristaux de CPPD incubés avec de l'ALP et de la polyamine. Cristaux de CPPD incubés dans une solution tampon de 0,1 M de Tris à 37°C pendant 72 h. (A) cristaux de CPPD seuls ; (B) cristaux de CPPD incubés avec 10 U d'ALP ; des puits rectangulaires indiquant de la dissolution sont observés sur la face en bout du cristal ; (C) cristaux de CPPD incubés avec 10 U d'ALP et 1 mM de spermine ; des puits rectangulaires plus petits mais plus nombreux qu'en (B) sont observés, mais seulement sur la face en bout de cristal (Shinozaki and Pritzker, 1995).

- ***bisphosphonates ou diphosphonates***

Les bisphosphonates, ou diphosphonates, sont des molécules indiquées dans le traitement de l'ostéoporose et dans certains cas de métastases osseuses (Verron et al., 2010). A noter que ces composés qui semblent avoir des effets sur la formation de phosphate de calcium et la calcification *in vitro* et *in vivo* possèdent des liaisons P-C-P pour lesquelles une analogie peut être faite avec les liaisons P-O-P présentes au sein des pyrophosphates inorganiques et autres phases condensées de phosphates. Cependant, à la différence des phosphates présents dans l'os, les bisphosphonates ne sont que très difficilement résorbés par les ostéoclastes car ils inhibent l'activité de ces cellules qui habituellement résorbent l'os « vieux » pendant que les ostéoblastes en fabriquent du « neuf » et rendent donc les phosphates de calcium auxquels ils sont associés peu résorbables. Shinozaki *et al.* (Shinozaki and Pritzker, 1996) ont montré que les bisphosphonates, l'orthovanadate, le cadmium et les ions Ca^{2+} inhibent l'activité de l'ALP. Le taux d'inhibition pour des concentrations identiques intervient dans l'ordre suivant : orthovanadate > cadmium > calcium. Cette étude suggère qu'à forte concentration les bisphosphonates inhibent la dissolution des cristaux de CPPD via l'inhibition de l'activité de l'ALP en raison de leur affinité avec la surface des cristaux de CPPD.

En 2002, Christoffersen et Christoffersen (Christoffersen and Christoffersen, 2003) ont montré que les bisphosphonates (acide 1-hydroxyéthane 1,1-diphosphonique (EHDP)) retardent la formation ou inhibent la croissance des phases t-CPPD et m-CPPT β pour une concentration supérieure à 10 μ M. Ceci serait dû à une supposée adsorption de ce composé EHDP à la surface du cristal due à la ressemblance chimique avec les CPP. Cependant ils n'ont pas observé d'effet provoqué par les bisphosphonates sur la dissolution des phases t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT β . Il est difficile de comprendre pourquoi l'EHDP n'a apparemment pas d'effet significatif sur les taux de dissolution des CPP, alors qu'il a un effet fortement inhibiteur sur les taux de dissolution de l'hydroxyapatite (HAP) (Christoffersen et al., 1983). Une explication possible pourrait être que la distance entre les ions Ca^{2+} à la surface de l'HAP est plus courte que celle à la surface des CPP.

- **Interactions ions pyrophosphate - orthophosphate**

Cheng *et al.* (Cheng and Pritzker, 1983) ont montré que le ratio orthophosphate/pyrophosphate est déterminant pour la forme de CPPD obtenue à l'issue de la cristallisation. Il paraîtrait qu'à de faibles concentrations en orthophosphate la formation de cristaux de CPPD est partiellement inhibée par les phosphates. Alors qu'à de fortes concentrations en orthophosphate, des CPP, des orthophosphates de calcium et des composés amorphes mixtes pyrophosphate-orthophosphate sont formés.

Les différents travaux effectués jusqu'ici sur la cristallisation et la dissolution des CPPD ont montré que quelques additifs ont une influence sur la cristallisation et la dissolution des pyrophosphates de calcium. Parmi les additifs étudiés on note la présence de l'ion Mg^{2+} . Cet ion fait partie avec le Cu^{2+} , Zn^{2+} et Fe^{3+} des ions naturellement présents dans le corps humain. Les ions Cu^{2+} , Zn^{2+} et Fe^{3+} tout comme l'ion thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) ont déjà fait l'objet d'études sur l'influence d'additifs en précipitation en qualité d'additif mais leur action sur la formation des CPP n'a jamais été étudiée. Nous avons choisi d'étudier par la suite l'influence des ions Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} et $S_2O_3^{2-}$ sur la formation des CPP. Cela permettra non seulement d'étudier l'influence de simples additifs sur la formation mais aussi d'étudier l'interaction entre les cristaux de CPPD et des ions présents fluides corporels. Comme le suggère Christoffersen *et al.* (Christoffersen et al., 2001) une telle étude pourra éventuellement permettre de comprendre les processus impliqués *in vivo* et donc faire émerger des méthodes possibles de prévention et de traitement de la maladie à cristaux de CPPD.

I-7 Conclusion - Positionnement de la thèse

Rappelons que l'objectif de cette étude bibliographique est de poser les bases d'une étude sur des additifs pouvant être promoteurs de dissolution ou inhibiteurs de la cristallisation des cristaux de CPP hydraté associés à l'arthrose. Ceci dans le but de mettre au point une stratégie thérapeutique à long terme pour soigner l'arthrose.

La thèse de Pierre Gras (Gras, 2014) au CIRIMAT a permis de synthétiser et de caractériser les pyrophosphates de calcium présentant un intérêt biologique pour cette étude.

Il s'agit maintenant de déterminer les cinétiques de formation de différents types de pyrophosphates de calcium d'intérêt biologique (m-CPPD, t-CPPD, m-CPPT β et a-CPP) et ce en présence ou non de différents additifs pour parvenir à promouvoir la dissolution des

CPP ou inhiber leur cristallisation. Les quelques études précédemment effectuées sur la formation et/ou la dissolution de CPP en présence d'additifs ainsi que le classement des différents types d'additifs potentiels que nous avons effectué, ont permis de déterminer et choisir une famille d'additifs ioniques à tester lors de la synthèse de CPP en conditions contrôlées.

Dans un second temps, un dispositif expérimental simplifié permettant de simuler le milieu vivant (composition constante et présence ou non de ménisque arthrosique) sera utilisé afin d'étudier les étapes de nucléation et de croissance des cristaux de CPP en présence ou non des mêmes additifs ioniques. Une démarche d'identification des cinétiques de cristallisation sera effectuée dans ce milieu.

Une étude à partir de spécimens biologiques (ménisques arthrosiques) fournis par les rhumatologues partenaires de ce projet, sera menée dans la perspective d'adapter un dispositif expérimental pour se rapprocher du milieu vivant afin de parvenir à la réalisation future d'une étude et de caractérisations plus fines des effets remarquables d'additifs précédemment identifiés.

Chapitre - II

**Etude de l'influence d'additifs ioniques sur la
précipitation de pyrophosphates de calcium
hydratés, en conditions contrôlées**

II-1 Introduction

Les conditions de formation des pyrophosphates de calcium ainsi que les paramètres physico-chimiques influençant cette formation ont été peu étudiés jusqu'à ce jour. Récemment, Gras (Gras, 2014) a étudié l'effet de deux de ces paramètres, la température et le pH, dans une gamme relativement large ($T_{\text{amb}} < T < 90^{\circ}\text{C}$ et $3,6 < \text{pH} < 7$). Il a aussi déterminé la structure de la phase m-CPPD restée irrésolue jusqu'à récemment (Gras et al., 2016b), et étudié l'évolution *in-vitro* de différentes phases de CPP ainsi que certaines de leurs propriétés physico-chimiques. Cependant les mécanismes de leur formation et évolution en milieu vivant ou plus simplement en milieu aqueux sont encore mal connus. L'influence de la composition très complexe des milieux articulaires et du cartilage sur les phénomènes de cristallisation reste un champ de recherche peu exploré.

La présence d'ions tels que Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} dans le corps humain et plus particulièrement dans le milieu articulaire pourrait être un facteur important de la formation des CPPD *in-vivo*. Ces ions ainsi que l'ion thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) pourraient potentiellement influencer la formation de CPPD *in-vivo*. Comme expliqué au chapitre précédent, étudier et comprendre les mécanismes de précipitation des différentes formes de CPP présentant un intérêt biologique et médical, en milieu aqueux en présence de Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ est un premier pas vers la compréhension de la formation de CPPD dans les articulations arthrosiques et ouvrent la voie vers l'identification d'ions d'intérêt pour la mise au point à moyen à long terme, d'un traitement thérapeutique pour l'arthrose et la pseudo-goutte.

Ce chapitre porte sur l'étude de la synthèse en présence d'additifs ioniques des phases t-CPPD et m-CPPD, identifiées *in-vivo*, ainsi que la phase m-CPPT β précurseur *in-vitro* des phases CPPD identifiées *in-vivo*. Lors de campagnes expérimentales, ces trois différentes phases cristallisées de CPP hydratés seront respectivement synthétisées en conditions contrôlées en présence ou non d'un additif ionique choisi parmi : Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. Dans un premier temps, le dispositif et le protocole expérimental utilisés seront présentés. Puis les résultats obtenus pour chaque campagne des synthèses réalisées en conditions d'obtention respective des phases t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT β seront analysés et discutés. Et enfin, nous concluons sur les effets constatés des additifs étudiés, sur la formation *in-vitro* de CPP hydratés d'intérêt biologique.

II-2 Procédé de précipitation de pyrophosphates de calcium hydratés

II-2-1 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé est une transposition, en réacteur de précipitation classique, de la méthode de synthèse de CPP mise au point par Gras *et al.* dans un erlenmeyer (Gras *et al.*, 2013b).

Le dispositif utilisé schématisé sur la figure II.1, est constitué d'un réacteur de 500 mL à fond bombé, double enveloppe en verre, équipé de 4 contres-pales, d'un couvercle et d'une sonde de pH. La régulation de la température est assurée par un cryostat relié à une sonde externe de température. Un arbre d'agitation en téflon fixé à un moteur a été utilisé pour assurer un mélange homogène.

Les phases t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT β ont été synthétisées par double décomposition via l'ajout simultané à débit constant, d'une solution de pyrophosphate de potassium et d'une solution de nitrate de calcium, à l'aide de deux poussettes- seringues (Harvard Apparatus PHD 2000) dans le réacteur contenant initialement une solution tampon à pH acide choisi. L'équation de la réaction de précipitation de CPP hydratés est la suivante :

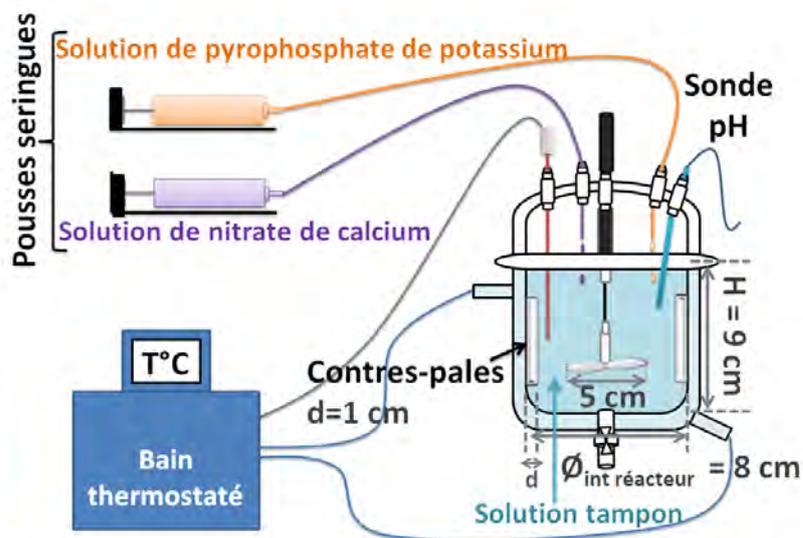


Figure II-1- Configuration standard du dispositif de précipitation en réacteur agité.

II-2-2 Protocole expérimental

Les deux solutions de réactifs anionique et cationique ont été préparées à température ambiante par dissolution respectivement de $K_4P_2O_7$ ($8,70 \cdot 10^{-3}$ mol) et de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ($1,74 \cdot 10^{-2}$ mol) dans 115 mL d'eau. Une solution tampon d'acétate d'ammonium à pH acide ($3,6 < \text{pH} < 5,8$) a été préparée à partir d'un mélange d'acide acétique et d'ammoniaque dans de l'eau. C'est dans cette solution tampon qu'aura lieu la précipitation.

La solution tampon est portée à la température choisie après avoir réalisé une étude préliminaire de balayage de différentes conditions opératoires (voir paragraphe II.3). Ensuite, 100 mL de chacune des solutions de réactifs de précipitation sont ajoutés simultanément à débit constant ($2,25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) dans un pied de solution tampon (200 mL). Pour les synthèses réalisées en présence d'un additif ionique, ce dernier est ajouté avant le début de la précipitation soit dans la solution tampon placée dans le réacteur soit dans une des seringues contenant une solution de réactif (dans la solution anionique pour un additif anionique et dans la solution cationique pour un additif cationique). Les concentrations d'additifs ioniques, calculées par rapport au volume total de la solution dans le réacteur à la fin de la précipitation, sont respectivement égales à 0,1 et 1 mM de Zn^{2+} , de Mg^{2+} , de Cu^{2+} ou de Fe^{3+} , ainsi que 0,03 mM de Fe^{3+} et 1 et 5 mM de $S_2O_3^{2-}$. Excepté pour l'ion thiosulfate qui n'est pas naturellement présent dans le corps humain, ces concentrations théoriques d'additifs en fin de précipitation ont été choisies comme étant de l'ordre de grandeur de celles rencontrées dans le plasma sanguin (1 mM de Mg^{2+} dissocié, 0,002 à 0,04 mM de Fe^{3+}) (Yajnik et al., 1984), (Oyane et al., 2003), (Jacobs et al., 1972), (Walters et al., 1973), dans les constituants du sang (0,02-0,03 mM de Zn^{2+} dans les globules rouges (Lindeman et al., 1971), ou encore dans la sueur ($18,10 \pm 3,90 \mu\text{M}$ de Cu^{2+} dans la sueur du bras), dans le sérum ($0,00 \mu\text{M}$ Cu^{2+} pour un patient en bonne santé, $0,64 \pm 1,10 \mu\text{M}$ de Cu^{2+} pour un patient arthrosique) et dans le liquide synovial ($1,10 \pm 1,65 \mu\text{M}$ Cu^{2+} pour un patient arthrosique) (Halliwell and Gutteridge, 1985).

A la fin de l'ajout des solutions de réactifs, une étape de maturation du précipité est réalisée dans la solution de précipitation maintenue à la température de la précipitation pendant 10 minutes. Le précipité est ensuite filtré sur Büchner et lavé avec 1200 mL d'eau dé-ionisée avant d'être séché dans une étuve à 37°C durant au moins 12 h. Les échantillons obtenus ont été conservés à température ambiante dans des pots fermés ; ils ont ensuite été caractérisés par différentes techniques.

II-3 Expériences préliminaires d'exploration des domaines de prédominance des phases

Préalablement à l'étude de l'action des additifs ioniques et afin de choisir des conditions opératoires conduisant à des phases pures de CPP, des synthèses ont été réalisées pour différents couples de pH et de températures. Les paramètres propres au procédé tels que la vitesse d'agitation du réacteur et le débit d'introduction des réactifs, ont également été explorés dans certains cas, pour améliorer la pureté des phases produites.

II-3-1 Effet du débit et de la vitesse d'agitation sur la formation de pyrophosphates de calcium hydratés

La Figure II-2 présente le diagramme température-pH d'obtention des phases pures ou de mélanges de phases de CPP dans différentes conditions de débit et de vitesse d'agitation. A titre de comparaison, les domaines d'obtention des phases de CPP obtenues précédemment avec l'utilisation du dispositif expérimental mis au point par Gras *et al.* sont superposés à ceux de la présente étude sur la Figure II-2. Cette figure a été réalisée à partir de résultats d'analyses semi-quantitatives faites par DRX selon la méthode PONKCS (Partial or No Known Crystal Structure) décrite par Scarlett et Madsen (Scarlett and Madsen, 2006), et Madsen *et al.* (Madsen et al., 2011) qui est présentée dans l'annexe n°2. Il s'agit d'une approche de quantification directe où la contribution de la phase amorphe sur les diffractogrammes RX est directement utilisée pour estimer sa proportion massique dans le mélange de phases. La précision de cette méthode est de $\pm 1\%$ (m/m) sur les valeurs déterminées pour le pourcentage relatif de chacune des phases constituant les poudres de CPP synthétisées. Tous les pourcentages relatifs de CPP obtenus pour chaque essai ne sont pas répertoriés sur la Figure II-2. Seuls quelques points d'intérêt y sont reportés et les autres sont exprimés à l'aide d'un code couleur. Par rapport aux travaux antérieurs (Gras, 2014), on constate : i) un élargissement du domaine d'obtention de l'a-CPP pur vers les pH acides et les hautes températures ; ii) un élargissement du domaine d'obtention du m-CPPT β pur vers des pH légèrement moins acides ; iii) une forte réduction du domaine d'obtention du t-CPPD pur et ; iv) la disparition du domaine d'obtention du m-CPPD pur (pH 5,8 / 90°C).

Notons que la vitesse d'agitation utilisée (barreau aimanté à 400 tr.min⁻¹) dans le dispositif expérimental (erlenmeyer non thermostaté) mis au point par Gras *et al.* ne peut pas être comparée à celle que l'on a utilisée dans le nouveau dispositif, car dans le premier cas, un barreau aimanté associé à une plaque d'agitation est utilisé (mélange non homogène ; vortex) alors que dans ce dernier cas, la synthèse est faite en réacteur de précipitation parfaitement agité (mélange homogène). La différence entre les deux dispositifs de même volume, provient donc des conditions hydrodynamiques.

Dans les conditions débit/vitesse d'agitation (200 tr.min⁻¹/2,25 mL.min⁻¹(a)) la zone d'obtention de la phase m-CPPD pure précédemment identifiée par P. Gras (Gras 2014) n'est pas produite pour notre configuration en réacteur. C'est pourquoi nous avons testé d'autres couples proches du dernier couple pH-température pour lequel la plus forte proportion de m-CPPD a été obtenue et dont les valeurs sont reportées dans le Tableau II-1.

Tableau II-1 – Couples débit et vitesse d'agitation testés pour des synthèses de CPP.

	a	b	c	d	e	f	g	h
Agitation (tr.min⁻¹)	200	400	50	100	100	100	100	280
Débit (mL.min⁻¹)	2,25	2,25	2,25	1,125	0,56	0,28	0,11	0,56

La Figure II-2 illustre les diagrammes des domaines d'obtention des phases de CPP en fonction du pH et de la température obtenues pour les différents couples débit et vitesse d'agitation répertoriés dans le Tableau II-1 et comparé à ceux déterminés par P. Gras (Gras 2014).

Lorsque la vitesse d'agitation augmente de 200 à 400 tr.min⁻¹ (conditions (a) changées en (b)) pour un couple pH / température donné (autour de 4,3 / 90°C), les proportions relatives de t-CPPD et m-CPPD diminuent au profit de l'augmentation de celle de l'a-CPP. De plus, la zone d'obtention d'un mélange de t- et m-CPPD est réduite et décalée vers les pH plus acides (Figure II-2).

Lorsque la vitesse d'agitation est diminuée de 200 à 50 tr.min⁻¹ pour un couple pH / température donné (autour de 4,3 / 90°C), la poudre obtenue dans les conditions (a) à 90°C et pH 4,1 est composée de 60% m-CPPD, 30% t-CPPD et 9% a-CPP et la poudre obtenue dans

les conditions (c) est composée de 6% m-CPPD et 94% a-CPP (Figure II-2). Une diminution de la proportion massique relative de m-CPPD et une disparition de celle de t-CPPD est observée.

Pour des vitesses d'agitation élevées ($> 200 \text{ tr.min}^{-1}$) et/ou de faibles débits (50 mL.min^{-1}), les proportions massiques relatives de m-CPPD et t-CPPD diminuent fortement au profit de l'augmentation de la proportion d'a-CPP.

Lorsque la vitesse d'agitation et le débit sont respectivement diminués de 200 à 100 tr.min^{-1} et de 2,25 à $1,125 \text{ mL.min}^{-1}$ à 90°C et pH 4,1, la proportion massique relative de t-CPPD passe de 30% (conditions (a)) à 50% (conditions (d)) au détriment des phases m-CPPD et a-CPP. A 90°C et pH 4,4, les proportions massiques relatives de chaque CPP sont similaires à celles obtenues à 90°C et pH 4,1 dans la condition (a). On observe un décalage de la zone d'obtention de mélange de m-CPPD et t-CPPD vers le pH moins acides. De plus, cette zone s'agrandit.

Lorsque le débit est diminué de $1,125$ à $0,56 \text{ mL.min}^{-1}$ pour le couple pH 4,57 / 90°C en changeant les conditions (d) en (e), le pourcentage relatif de m-CPPD augmente de 23% à 81% au détriment du pourcentage relatif d'a-CPP passant de 77% à 19%. La diminution du débit profite à la formation d'une plus grande proportion de m-CPPD dans les échantillons de CPP synthétisés.

Suite à cela, pour essayer d'obtenir une phase de m-CPPD pure le débit a été diminué de $0,56$ à $0,28$ et $0,11 \text{ mL.min}^{-1}$ pour le couple pH 4,57 / 90°C (conditions (e) en (f) et (g), respectivement). Le pourcentage relatif de m-CPPD contenu dans les échantillons synthétisés a alors respectivement diminué de 81% à 18% et 38% au profit de l'augmentation du pourcentage relatif de phase t-CPPD passant de 0% à 74% et 45%. Il existe donc un optimum pour la valeur du débit d'ajout des solutions de réactif lors de la synthèse des CPP.

Pour former les phases de t- et m-CPPD les plus pures possible pour un grand nombre de couples pH/température, les synthèses doivent être réalisées à un faible débit ($< 2,25 \text{ mL.min}^{-1}$), et pour un optimum de vitesse d'agitation à 100 tr min^{-1} .

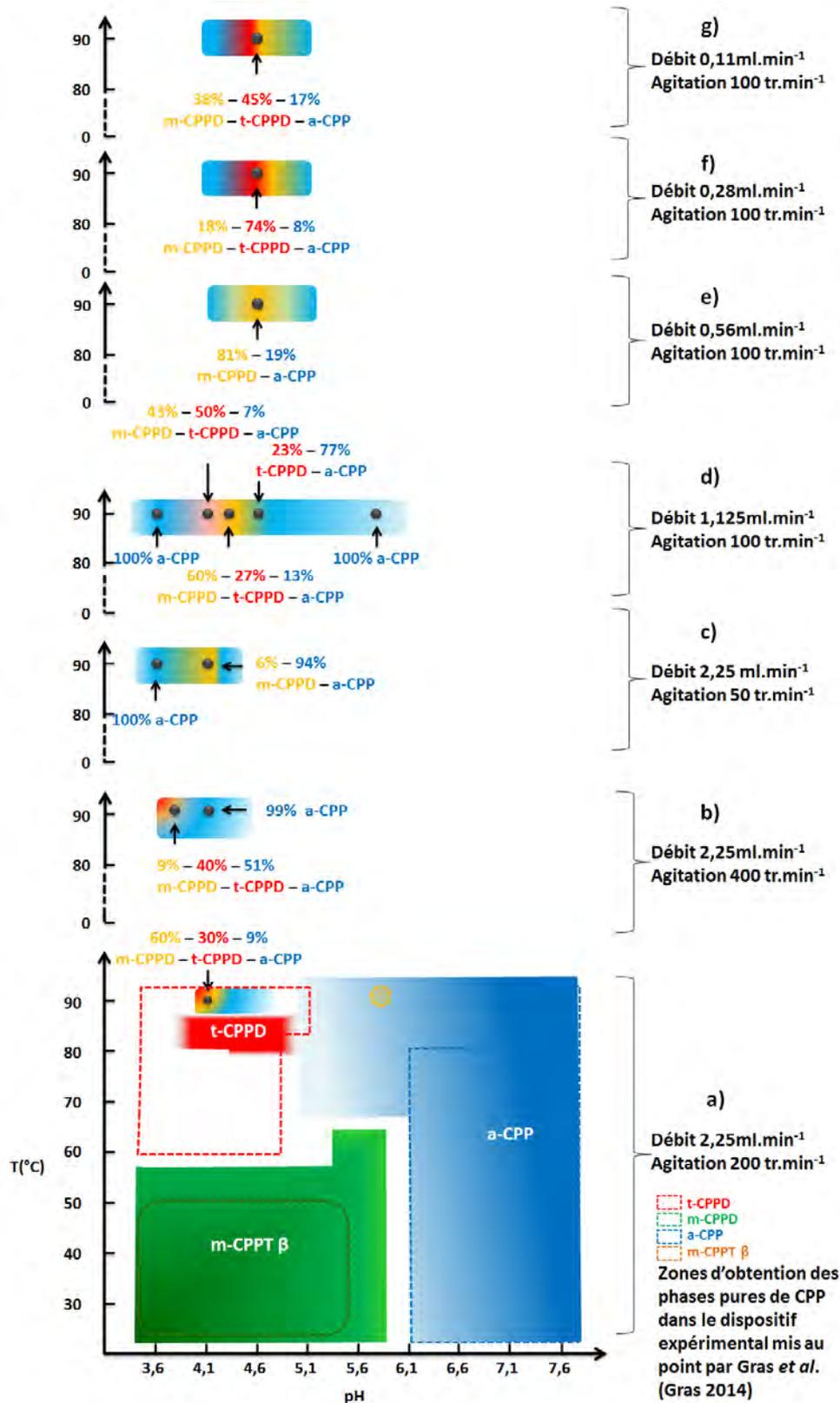


Figure II-2- Diagramme d'obtention des phases pures et mélanges de phases de CPP en fonction du pH et de la température à un débit de 2,25 mL.min⁻¹ et une vitesse d'agitation de 200 tr.min⁻¹ (a) ; un débit de 2,25 mL.min⁻¹ et une vitesse d'agitation de 400 tr.min⁻¹ (b) ; un débit de 2,25 mL.min⁻¹ et une vitesse d'agitation de 50 tr.min⁻¹ (c) ; un débit de 1,125 mL.min⁻¹ et une vitesse d'agitation de 100 tr.min⁻¹ (d) ; un débit de 0,56 mL.min⁻¹ et une vitesse d'agitation de 100 tr.min⁻¹ (e) ; un débit de 0,28 mL.min⁻¹ et une vitesse d'agitation de 100 tr.min⁻¹ (f) ; un débit de 0,11mL.min⁻¹ et une vitesse d'agitation de 100 tr.min⁻¹ (g). Les expériences ont été dupliquées et les pourcentages massiques relatifs sont donnés avec une précision de ± 1%.

On peut aussi conclure qu'un mélange nécessaire mais imparfait (vitesse et débit d'ajout suffisamment faibles ou l'utilisation d'une synthèse en erlenmeyer avec un barreau aimanté associé à une plaque d'agitation (Gras et al., 2013b)) favorise la possibilité d'obtenir des phases pures et mélange de CPPD sur une plus grande gamme de couples pH / température. Ces deux phases (t- et m-CPPD) sont les phases de CPP évoquées dans cette étude les plus difficiles à obtenir pures et qui nécessitent d'être réalisées dans des conditions de mélange pour lesquelles les ions précurseurs ($P_2O_7^{4-}$ et Ca^{2+}) ne se rencontrent pas trop rapidement sous peine de former une phase amorphe. En effet Gras *et al.* (Gras et al., 2013b) indiquaient déjà qu'il fallait ajouter les réactifs dans la solution tampon au cours de la synthèse de CPP en les insérant dans le réacteur par deux embouchures diamétralement opposées.

Un rapide calcul du temps de micromélange dans notre réacteur peut être fait avec l'équation II.1, (Vicum et al., 2004)

$$t_{DM} = 17,24 \sqrt{\frac{\nu}{\varepsilon}} \cdot \left(0,030 + \frac{17,050}{Sc} \right) \quad (II-2)$$

avec :

- ε : taux de dissipation d'énergie (-),
- ν : la viscosité cinématique du fluide ($m^2.s^{-1}$),
- Sc : Le nombre adimensionnel de Schmidt (rapport entre viscosité cinématique et coefficient de diffusion).

On a évalué pour une agitation de 100 tr.min^{-1} un temps de micromélange de 6 ms et de 2 ms pour une vitesse d'agitation de 200 tr.min^{-1} .

On peut donc penser que les temps caractéristiques de réaction t_R (Equation (II-3)) entre le Ca^{2+} et le $P_2O_7^{4-}$ (Equation(II-4)) (dépendant d'une constante cinétique k) pour les phases m-CPPD, t-CPPD et a-CPP sont du même ordre de grandeur que des temps caractéristiques de micromélange t_{DM} . Plus particulièrement le postulat d'une cinétique de réaction de la phase m-CPPD plus faible que celle de la phase a-CPP expliquerait l'existence d'un couple débit (effet de sursaturation), vitesse d'agitation (état de mélange) optimum pour favoriser la formation de phases pures monoclinique et triclinique.



$$t_R = \frac{1}{k([\text{Ca}^{2+}]^2 + [\text{P}_2\text{O}_7^{4-}])} \quad (\text{II-4})$$

Intuitivement on peut donc penser qu'une sursaturation faible (débit de réactifs faible) couplée à un « mauvais » mélange permettrait, dans le cas des pyrophosphates de calcium hydratés, la croissance de phase cristalline organisée plutôt qu'une phase amorphe.

Toutes ces synthèses ont été réalisées avec un précurseur de $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ obtenu par calcination (4 heures à 400°C) de K_2HPO_4 provenant du même lot que celui utilisé par Gras *et al.* (Gras 2014) lors de leur synthèse. Des analyses par DRX et spectroscopie IR ont montré que le sel précurseur $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ préparé et utilisé par Gras *et al.* et celui de la présente étude étaient strictement les mêmes (résultats en annexe 4). Au cours de ce travail, le premier lot de $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ étant épuisé, nous avons été amenés à utiliser un nouveau lot. Des analyses par DRX et spectroscopie FTIR ont montré que le $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ issu du nouveau lot était pur mais que le spectre FTIR de ce $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ présentait des intensités de bandes de vibration différentes. Cette différence a eu des répercussions lors des synthèses de CPP qui ont suivi.

II-3-2 Effet du débit et de la vitesse d'agitation sur la formation de pyrophosphates de calcium hydratés à partir d'un précurseur de $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ provenant d'un nouveau lot

La Figure II-3 représente le diagramme d'obtention des phases pures et mélanges de phases de CPP synthétisés à partir d'un nouveau lot de $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$, en fonction du pH, de la température et pour les différents couples débit /vitesse d'agitation nommés (e), (h) et (d) (Tableau II-1). Cette figure a été réalisée à partir de résultats d'analyses semi-quantitatives faites par DRX. Tous les pourcentages massiques relatifs de CPP obtenus pour chaque essai ne sont pas répertoriés sur la Figure II-3. Seuls quelques points d'intérêt y sont représentés et les autres sont exprimés à l'aide d'un code couleur.

La poudre synthétisée à partir de ce nouveau lot de $K_4P_2O_7$ à $90^\circ C$ et pH 4,57 pour une vitesse d'agitation de 100 tr.min^{-1} et un débit de $0,56 \text{ mL.min}^{-1}$ (e) est constituée de 15% m-CPPD, 31% t-CPPD et 51% a-CPP (Figure II-3), alors qu'avec le $K_4P_2O_7$ d'origine de Gras *et al.* (Gras 2014), elle était constituée de 81% m-CPPD et 19% a-CPP (Figure II-2). Deux essais ont été réalisés à pH 4,57 et $90^\circ C$ pour un débit d'ajout et une vitesse d'agitation respectivement diminué et augmentée (conditions (e) respectivement changées en (d) et (h)). Les poudres de CPP ainsi obtenues sont constituées de 32% m-CPPD, 61%, t-CPPD, 7% a-CPP et 43% m-CPPD, 44% t-CPPD, 13% a-CPP. Les conditions permettant d'obtenir le plus fort pourcentage relatif de CPPD et le plus faible pourcentage d'a-CPP sont les conditions (d). Nous utiliserons donc les conditions de mélange (d) (agitation 100 tr.min^{-1} ; débit $1,25 \text{ mL.min}^{-1}$) pour la suite de l'étude. Avant d'étudier l'influence d'additifs sur la formation des CPP hydratés, nous avons déterminé l'influence du pH et de la température sur celle-ci lorsque les CPP sont obtenus à partir d'un précurseur de $K_4P_2O_7$ provenant d'un nouveau lot en vue de parvenir à obtenir les phases les plus pures possibles. Les résultats de cette étude sont présentés au paragraphe suivant.

II-3-3 Effet du pH et de la température sur la formation de pyrophosphates de calcium hydratés à partir d'un précurseur de $K_4P_2O_7$ provenant d'un nouveau lot

Des synthèses de CPP ont été réalisées à $90^\circ C$ ou $95^\circ C$ pour des pH compris entre 3,6 et 5,9 dans les conditions (d) de débit et vitesse d'agitation (100 tr.min^{-1} et $1,125 \text{ mL.min}^{-1}$) (Tableau II-1) afin de déterminer le couple pH/température optimal pour l'obtention d'une phase pure ou majoritairement composée de m-CPPD. Ces conditions optimales sont $90^\circ C$, pH 5,8, 100 tr.min^{-1} et $1,125 \text{ mL.min}^{-1}$ (conditions (d); Figure II-3). Elles permettent d'obtenir une poudre de CPP composée à 85% de m-CPPD et seront utilisées dans la suite du travail pour la réalisation des synthèses faites dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPD en présence d'additifs ioniques (paragraphe II-5).

Cette première étape du travail a donc permis de définir les zones de prédominance des différentes phases du CPP et a démontré la sensibilité de la synthèse du m-CPPD vis-à-vis des paramètres relatifs aux matières premières ($K_4P_2O_7$) ou au procédé (vitesse d'agitation et débit d'introduction des réactifs). Ainsi les conditions de synthèse utilisées pour la suite de

l'étude concernant l'influence d'additifs ioniques sur la formation des phases t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT β sont reportées dans le Tableau II-2.

Tableau II-2- Conditions de température et pH choisies pour la réalisation des synthèses de CPP lors de l'étude de l'influence d'additifs ioniques sur leur formation pour une vitesse d'agitation de 100 tr.min⁻¹ et un débit de 1,125 mL.min⁻¹.

Phase de CPP synthétisée	t-CPPD	m-CPPD	m-CPPT β	a-CPP
Température	90°C	90°C	25°C	25°C
pH	3,6	5,8	3,6	5,8
Débit (mL.min ⁻¹)	1,125	1,125	1,125	1,125
Agitation (tr.min ⁻¹)	100	100	100	100

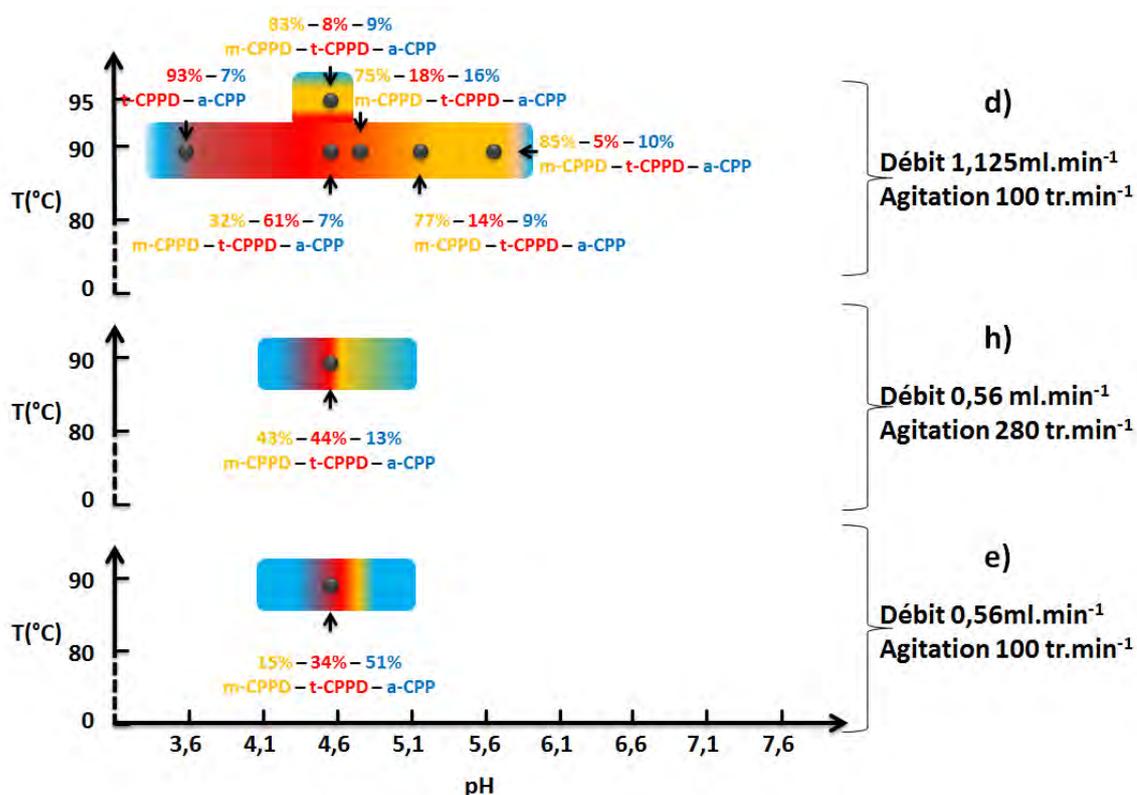


Figure II-3- Diagramme d'obtention des phases pures et mélanges de phases de CPP en fonction du pH et de la température à un débit de 0,56 mL.min⁻¹ et une vitesse d'agitation de 100 tr.min⁻¹ (e) ; un débit de 0,56 mL.min⁻¹ et une vitesse d'agitation de 280 tr.min⁻¹ (h) ; un débit de 1,125 mL.min⁻¹ et une vitesse d'agitation de 100 tr.min⁻¹ (d). Les expérimentations ont été dupliquées et les pourcentages massiques relatifs sont donnés avec une précision de $\pm 1\%$.

II-4 Influence d'additifs ioniques sur la précipitation de la phase t-CPPD en conditions contrôlées

Lors de cette partie l'influence des additifs ioniques Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} ou $S_2O_3^{2-}$ introduits selon deux voies différentes (initialement ajoutés dans la solution tampon (t) ou dans la solution de réactif cationique ou anionique (dans la seringue (s))) lors de la synthèse en conditions contrôlées pour l'obtention de la phase t-CPPD va être étudiée. Pour cela les poudres synthétisées en présence d'additifs ioniques seront analysées à l'aide de différentes méthodes de caractérisation structurale et chimique, (DRX, spectroscopies IR et RAMAN, ICP-OES, et RMN du solide).

II-4-1 Additif initialement présent dans la solution tampon : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX

La méthode de synthèse mise au point en réacteur agité a permis d'obtenir une poudre constituée majoritairement de la phase t-CPPD (par comparaison avec les données de référence de la fiche JCPDS n°00-041-0488) dans les conditions de pH (3,6) et température (90°C) choisis. Les diffractogrammes de RX de la phase prise comme référence dans cette étude (t-CPPD synthétisé en l'absence d'additif) ainsi que le produit des synthèses réalisées dans les conditions d'obtention de la phase t-CPPD en présence d'ions Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} ou $S_2O_3^{2-}$ initialement ajoutés dans la solution tampon (t), sont présentés sur la Figure II-4. Deux ou trois concentrations ont été testées pour chaque additif. Si on examine les diffractogrammes RX des échantillons synthétisés en présence d'un type d'additif ionique, on remarque qu'ils sont constitués principalement de CPP dihydratés cristallisés : m-CPPD, t-CCPD ou d'un mélange de ces deux phases. En effet, on observe les pics de Bragg caractéristiques de la phase t-CPPD ainsi qu'un pic additionnel plus ou moins intense autour de $2\theta = 12,01 \pm 0,02^\circ$ caractéristique de la phase m-CPPD (pic de Bragg 110) (Gras et al., 2016b). La présence de ce pic indique que la phase m-CPPD s'est formée en présence des différents additifs testés, excepté dans le cas du magnésium à basse concentration (0,1 mM) pour lequel ce pic n'est pas visible sur le diagramme DRX. En examinant plus finement les diagrammes DRX sur la Figure II-4, on note que l'intensité relative des deux principaux pics caractéristiques de la phase t-CPPD à $2\theta = 10,95^\circ \pm 0,02^\circ$ et $12,58^\circ \pm 0,02^\circ$ (pics de Bragg 010 et 100) décroît en faveur de l'augmentation de l'intensité relative du pic caractéristique de la phase m-CPPD à $2\theta = 12,01^\circ \pm 0,02^\circ$. Cette intensité augmente lorsque la concentration en additifs dans le milieu de précipitation augmente. En effet, dans le cas des concentrations les

plus élevées (1 mM) de Fe^{3+} , Zn^{2+} ou Cu^{2+} comme additif, on constate que les deux pics de diffraction aux faibles angles caractéristiques de la phase t-CPPD ne sont presque plus visibles. Cela montre que la phase cristalline majoritaire dans ces échantillons est la m-CPPD alors que dans le cas d'une forte concentration de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ou Mg^{2+} (respectivement 5 et 1 mM), la phase cristalline majoritairement présente dans l'échantillon reste la t-CPPD.

En supposant que la totalité des ions d'additifs (A) respectivement impliqués dans les synthèses de t-CPPD aient précipité comme sel de pyrophosphate d'additif-, le pourcentage de ce composé aurait été de 2,6% (molaire) soit 2,0 à 3,1 % m/m selon l'additif (Zn^{2+} , Cu^{2+} ou Mg^{2+}) et 4% (molaire) soit 3,9 % m/m dans le cas du pyrophosphate de fer (avec $\text{Fe}/\text{Pyro} = 4/3$ pour respecter l'électroneutralité du solide). Cette technique d'analyse a donc permis de montrer qu'aucune phase cristallisée de pyrophosphate de magnésium, de zinc, de cuivre ou de fer n'a précipité en quantité au-delà du seuil de détection (2%). De plus, les paramètres de maille calculés à partir des diagrammes DRX ont été attentivement vérifiés et ne montrent pas de différences significatives avec les paramètres de maille des composés de référence publiés (Gras et al., 2013a).

En agrandissant les diagrammes DRX autour de $2\theta = 30^\circ$, un léger halo diffus devient distinct en particulier dans le cas des fortes concentrations en Fe^{3+} , Zn^{2+} ou Cu^{2+} . La Figure II-5 montre le diffractogramme RX entre 20° et 45° de la poudre synthétisée en présence de 1 mM de Cu^{2+} ou de Fe^{3+} . Ce halo diffus est caractéristique de la présence d'une certaine proportion de phase amorphe (a-CPP) dans l'échantillon. Il est également présent sur les diffractogrammes RX des autres échantillons (t-CPPD de référence synthétisés en absence d'additif et poudres synthétisées en présence des autres additifs) mais la superposition de plusieurs diffractogrammes de RX (Figure II-4) a tendance à écraser l'intensité des pics et rend ce halo difficile à distinguer.

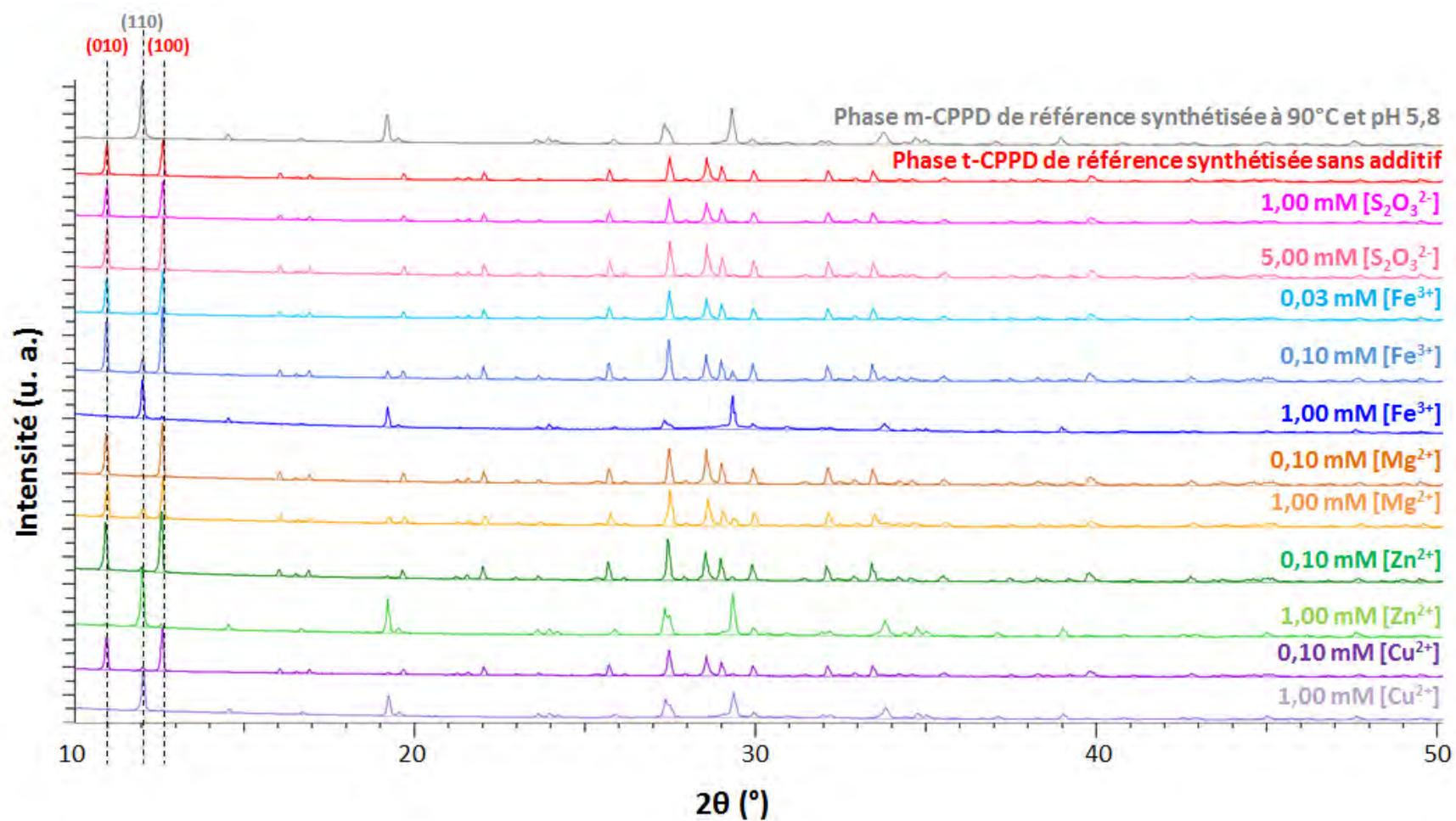


Figure II-4- Diagrammes DRX de la phase t-CPPD de référence (sans additif), d'une phase m-CPPD pure et des poudres synthétisées en présence de chaque additif présent à deux ou trois concentrations différentes dans la solution tampon (0,1 ou 1 mM de Mg²⁺, Zn²⁺ ou Cu²⁺; 0,025, 0,1 ou 1 mM de Fe³⁺ et 1 ou 5 mM S₂O₃²⁻)

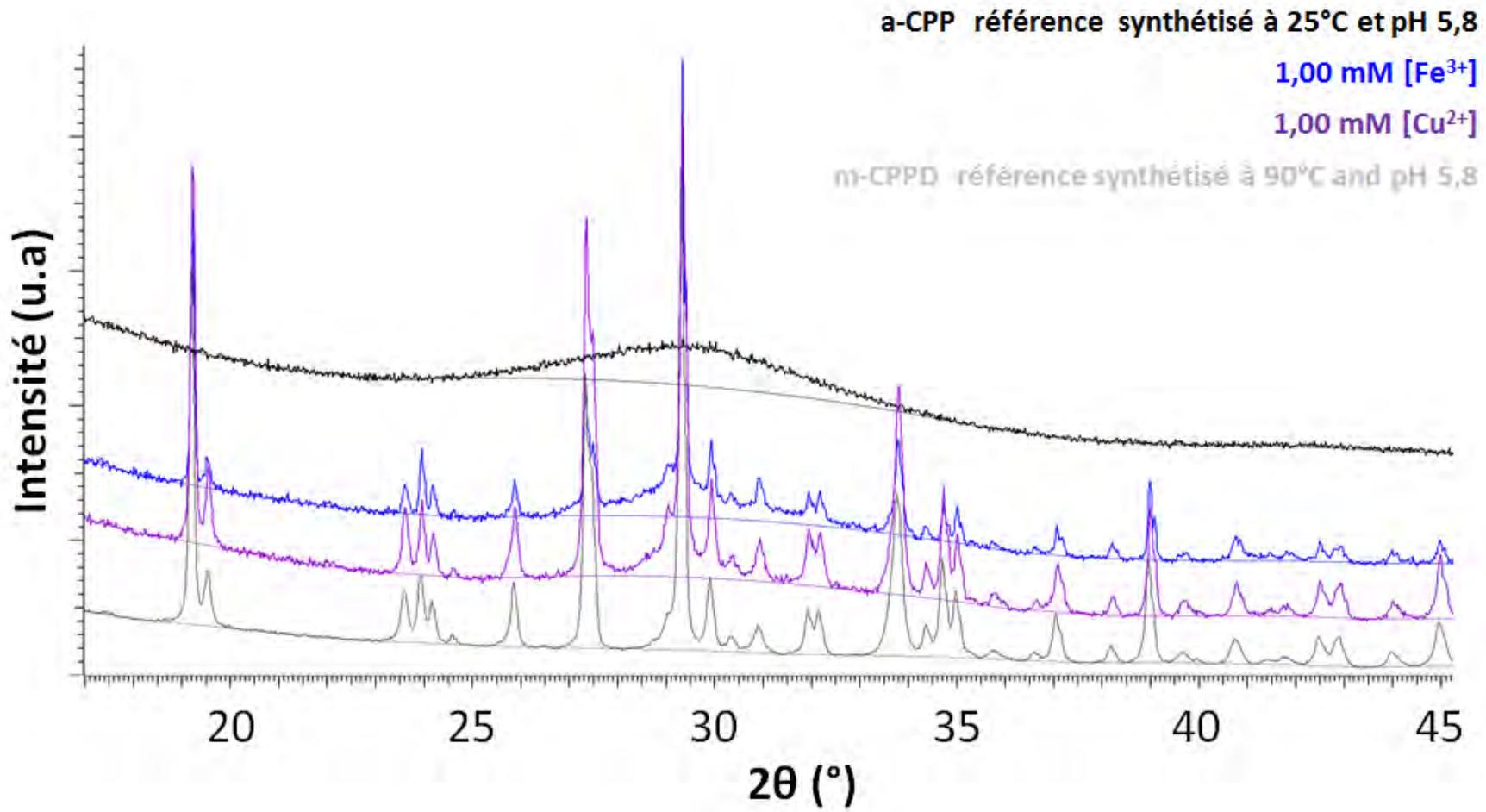


Figure II-5 - Diagramme DRX entre 20° et 45° (2θ) des produits synthétisés en présence de 1 mM de Cu²⁺ ou de Fe³⁺ présent dans la solution tampon (t) et des phases pures m-CPPD et a-CPP de référence.

Suite aux premières observations qualitatives faites, nous avons réalisé une étude semi-quantitative à partir des résultats de DRX selon la méthode détaillée dans l'Annexe n°2 afin de déterminer les proportions massiques relatives des phases m-CPPD, t-CPPD et a-CPP contenues dans les échantillons synthétisés (Tableau II.1). Il apparaît que l'échantillon de référence t-CPPD synthétisé sans additif n'est pas totalement pur et qu'il comporte une petite proportion (7%) de phase amorphe (a-CPP). De plus, la présence du halo diffus plus ou moins important sur les diagrammes DRX des composés précipités en présence d'un additif ionique (Figure II-5) confirme la présence de phase amorphe à hauteur de 5% à 62% selon l'additif ionique présent dans le milieu de précipitation (Figure II-4 et Figure II-5). On note aussi que la proportion massique relative de phase amorphe augmente significativement en présence de 1 mM de Zn^{2+} (20%), de Cu^{2+} (36%) et de Fe^{3+} (62%). Le pourcentage massique relatif de phase m-CPPD initialement égal à $0 \pm 1\%$ en l'absence d'additif ionique augmente également de 3% à 60% en présence respectivement de 1 mM de $S_2O_3^{2-}$ ou de Cu^{2+} . En revanche pour la gamme de concentration en ions $S_2O_3^{2-}$ utilisée, la présence de cet additif dans la solution tampon lors de la synthèse de la phase t-CPPD ne conduit à aucun changement significatif dans la composition finale de l'échantillon obtenu. Il apparaît que c'est la présence de 1mM d'ions Fe^{3+} , Zn^{2+} ou Cu^{2+} qui induit les changements les plus significatifs dans la composition des échantillons synthétisés : la présence de 1 mM de Zn^{2+} , Cu^{2+} ou Fe^{3+} inhibe partiellement la cristallisation de la phase t-CPPD et favorise principalement la formation de phase a-CPP (62%) en présence de Fe^{3+} et la formation de phase m-CPPD (75%) en présence de Zn^{2+} . Comme pour le composé a-CPP de référence la fraction d'a-CPP détectée est probablement associée avec 3 à 4 molécules d'eau (Slater et al., 2011), (Gras et al., 2016a), (Gras et al., 2013a). Pour les synthèses réalisées à faible concentration en additif ionique (0,1 mM) quel que soit le type d'ions ajoutés, la phase t-CPPD reste la phase majoritaire dans l'échantillon obtenu.

Ces résultats ont montré l'effet majeur qu'ont particulièrement les ions Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} et Fe^{3+} sur la cristallisation de la phase t-CPPD.

D'autres investigations structurales présentées plus loin ont été réalisées par RMN ^{31}P du solide et ont permis de fournir plus d'informations sur les phases qui ont précipité en présence d'additifs via les données de déplacement chimique du noyau ^{31}P et de temps de relaxation T_1 (^{31}P). En effet, T_1 (le temps de relaxation longitudinale) est un paramètre sensible à la présence potentielle d'ions paramagnétiques, tels que Cu^{2+} et Fe^{3+} dans les phases de CPP précipitées (Abragam, 1961).

Tableau II-3- Pourcentage massique relatif des différentes phases de CPP (m-CPPD, t-CPPD et a-CPP) présentes dans les échantillons synthétisés en présence ou non d'un additif ionique initialement présent dans la solution tampon (t). Toutes les expérimentations ont été dupliquées.

Concentration en additif ionique dans le milieu de précipitation	m-CPPD (% m/m)	t-CPPD (% m/m)	a-CPP (% m/m)
Sans additif (référence)	0 ± 1	93 ± 1	7 ± 1
[S ₂ O ₃ ²⁻] = 1,00 mM	3 ± 2	90 ± 1	7 ± 1
[S ₂ O ₃ ²⁻] = 5,00 mM	3 ± 1	89 ± 1	8 ± 1
[Mg ²⁺] = 0,10 mM	1 ± 1	94 ± 1	5 ± 1
[Mg ²⁺] = 1,00 mM	26 ± 1	69 ± 1	5 ± 1
[Fe ³⁺] = 0,03 mM	4 ± 1	89 ± 1	7 ± 1
[Fe ³⁺] = 0,10 mM	14 ± 1	80 ± 1	6 ± 1
[Fe ³⁺] = 1,00 mM	37 ± 1	1 ± 1	62 ± 1
[Zn ²⁺] = 0,10 mM	6 ± 1	84 ± 1	10 ± 1
[Zn ²⁺] = 1,00 mM	75 ± 1	5 ± 1	20 ± 1
[Cu ²⁺] = 0,10 mM	4 ± 2	93 ± 1	3 ± 1
[Cu ²⁺] = 1,00 mM	60 ± 1	4 ± 1	36 ± 1

II-4-2 Additif initialement présent dans l'un des deux réactifs (seringue) : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX

La Figure II-6 présente les diagrammes DRX de poudres de CPP synthétisées dans les conditions d'obtention de la phase t-CPPD en présence de 1 mM d'additifs ioniques initialement présents dans la solution de réactif cationique ou anionique (dans la seringue (s)) selon qu'il s'agisse respectivement d'un additif cationique ou anionique. Dans une première approche d'analyse qualitative (Figure II-6), on observe que les échantillons synthétisés en présence de 1 mM de Mg²⁺ ou S₂O₃²⁻ sont majoritairement composés de la phase t-CPPD alors que les échantillons synthétisés en présence de 1mM of Zn²⁺ ou Cu²⁺ sont composés d'un mélange des phases m-CPPD et t-CPPD, cette dernière étant la phase minoritaire du mélange. Les échantillons synthétisés en présence de 1 mM de Fe³⁺ sont principalement amorphes. Ces résultats montrent également que l'effet des ions Mg²⁺ et S₂O₃²⁻ est limité (l'intensité relative du pic de diffraction caractéristique de la phase m-CPPD à environ 12° est très faible) tandis que la présence de Cu²⁺ ou de Zn²⁺ favorise la précipitation de la phase m-

CPPD au détriment de t-CPPD et celle du Fe^{3+} inhibe la cristallisation des pyrophosphates de calcium.

En outre, il n'y a pas de phases cristallines de pyrophosphates de magnésium, zinc, fer ou cuivre ayant co-précipitées, compte tenu de la limite de détection (2%) des analyses par DRX ; comme indiqué précédemment pour les échantillons précipités à l'aide du protocole (t), si les phases de pyrophosphates d'additif cristallisées- avaient été présentes dans les échantillons elles auraient été détectables. De plus, comme présenté sur la Figure II-5 dans le cas de l'additif initialement présent dans la solution tampon, un halo diffus est également ici difficilement identifiable en raison de l'empilement des nombreux diagrammes DRX sur la Figure II-6 ; toutefois il devient visible si nous zoomons sur le domaine autour $2\theta = 30^\circ$ des diffractogrammes RX, en particulier pour les échantillons synthétisés en présence du Zn^{2+} ou du Cu^{2+} dans la seringue (s) de réactif de calcium (Figure II-7) témoignant de la présence d'une phase amorphe.

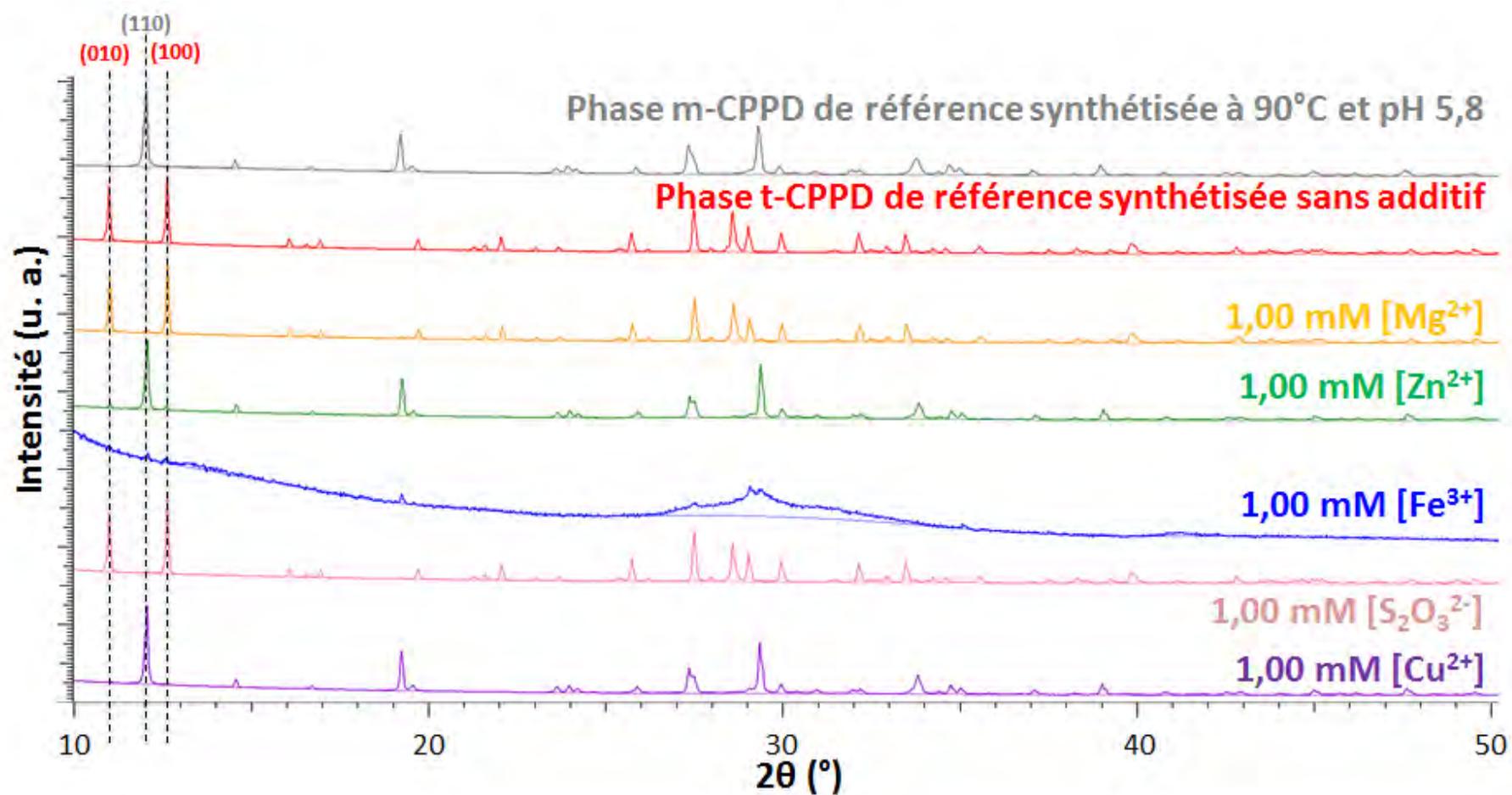


Figure II-6 - Diagrammes DRX de la phase t-CPPD de référence, d'une phase m-CPPD pure et des poudres synthétisées en présence de chaque additif initialement présent dans la solution de réactif (seringue, noté (s) dans le corps du texte) et conduisant à l'obtention d'une concentration en additif de 1 mM à la fin de la synthèse.

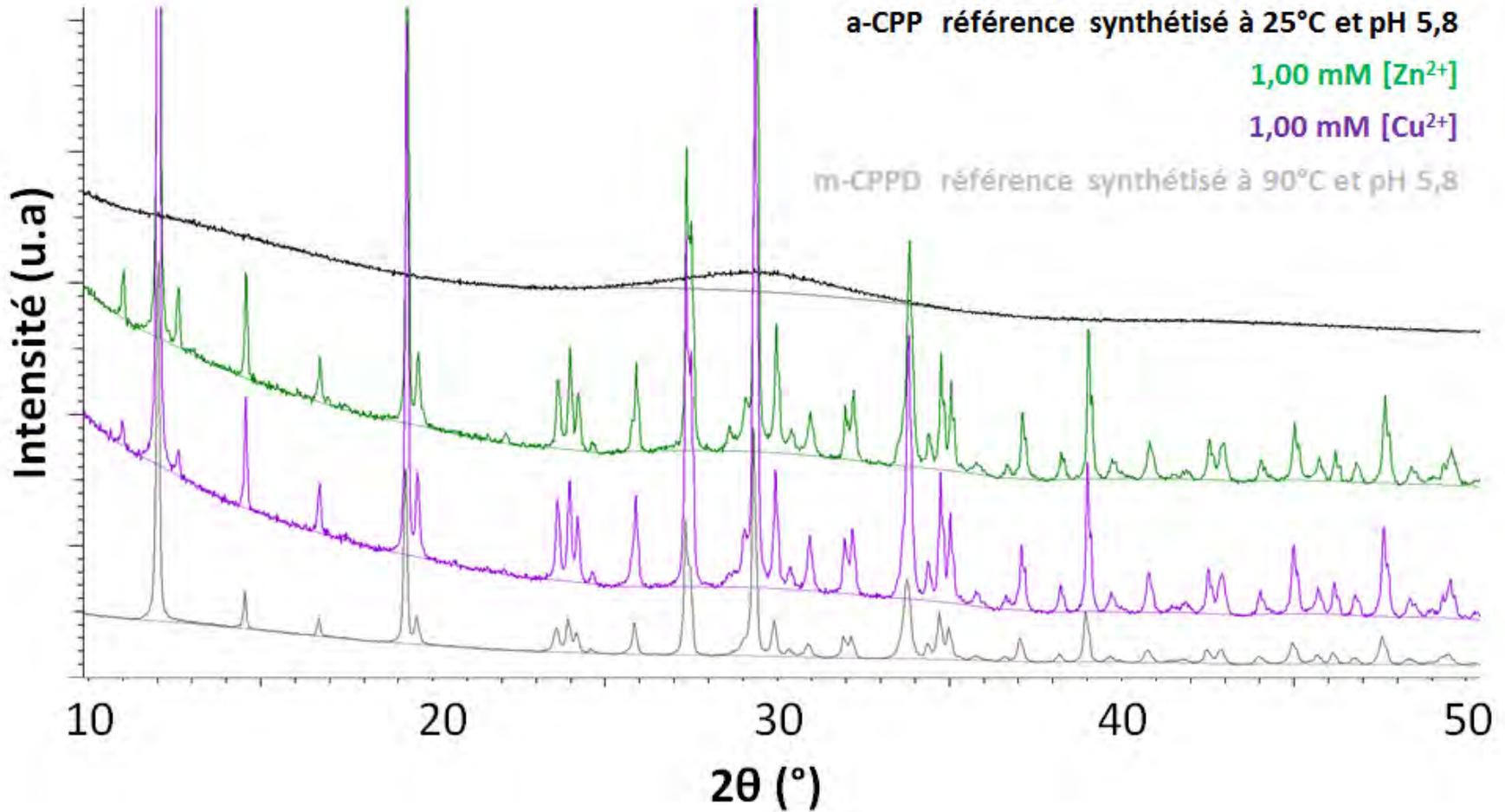


Figure II-7 - Diagrammes DRX de la phase a-CPP de référence, d'une phase m-CPPD pure et des poudres synthétisées en présence de 1 mM Cu^{2+} et Zn^{2+} initialement présent dans la solution de réactif (seringue, noté (s) dans le corps du texte) et conduisant à l'obtention d'une concentration en additif de 1 mM à la fin de la synthèse.

Les résultats de l'étude semi-quantitative réalisée à partir des diagrammes DRX présentés sur la Figure II-6 sont reportés dans le Tableau II-4. La présence de 1 mM d'ions Mg^{2+} ou $S_2O_3^{2-}$ lors de la synthèse n'entraîne visiblement pas de changement significatif dans la composition de l'échantillon synthétisé : il comprend principalement du t-CPPD (91%) ainsi que très peu de a-CPP (6%) et de m-CPPD (3%). Les résultats reportés dans le Tableau II-4 mettent en évidence l'effet déterminant de la présence de 1 mM d'ions Fe^{3+} , Zn^{2+} ou Cu^{2+} sur la composition des poudres synthétisées : le Zn^{2+} et le Cu^{2+} favorisent la formation de la phase m-CPPD en tant que phase majoritaire dans l'échantillon (respectivement 71% et 78%) ainsi que la formation d'un peu d'a-CPP (respectivement 25% et 20%), ce qui conduit à l'obtention d'échantillons ne comportant qu'une très faible proportion de t-CPPD (respectivement 4% et 2%), tandis que l'ion Fe^{3+} inhibe complètement la cristallisation des phases t-CPPD et m-CPPD. En effet, ces résultats semi-quantitatifs confirment les observations qualitatives faites précédemment (Figure II-6) : une proportion très élevée d'a-CPP (98%) a été évaluée dans les échantillons précipités en présence de 1 mM de Fe^{3+} . Le nombre de molécules d'eau associées à cette phase amorphe de CPP ($Ca_2P_2O_7 \cdot nH_2O$ avec $n = 3,2 \pm 0,1$, pour l'échantillon réalisé en présence de 1 mM of $Fe^{3+}(s)$), déterminé par analyse thermogravimétrique (ATG), est inférieur à celui reporté dans la littérature pour une phase pure d'a-CPP (n entre 3,8 et 4,2) (Slater et al., 2011),(Gras et al., 2016a),(Gras et al., 2013a) mais se trouve toujours dans la gamme comprise entre 3 et 4 molécules d'eau.

Tableau II-4- Pourcentage massique relatif des différentes phases de CPP (m-CPPD, t-CPPD et a-CPP) présentes dans les échantillons synthétisés en présence ou non d'un additif ionique initialement introduit dans une solution de réactif (seringue). Toutes les expérimentations ont été dupliquées.

Concentration finale en additif ionique dans le milieu de précipitation	m-CPPD (% m/m)	t-CPPD (% mm/)	a-CPP (% m/m)
Sans additif (référence)	0 ± 1	93 ± 1	7 ± 1
$[S_2O_3^{2-}] = 1,00$ mM	3 ± 1	91 ± 1	6 ± 1
$[Mg^{2+}] = 1,00$ mM	4 ± 2	90 ± 1	6 ± 1
$[Fe^{3+}] = 1,00$ mM	2 ± 1	0 ± 1	98 ± 1
$[Zn^{2+}] = 1,00$ mM	71 ± 1	4 ± 1	25 ± 1
$[Cu^{2+}] = 1,00$ mM	78 ± 1	2 ± 1	20 ± 1

Par ailleurs, l'échantillon formé en présence de 1 mM Fe^{3+} constitué presque totalement d'une phase amorphe a été analysé par spectroscopie FTIR afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition de cette phase amorphe. Les spectres de cet échantillon et

ceux des phases de référence, a-CPP, m-CPPD et t-CPPD synthétisées en l'absence d'additif, sont présentés dans le domaine $1300-450 \text{ cm}^{-1}$ (Figure II-8). Les bandes d'absorption observées se situent au même nombre d'onde que celles du CPP amorphe de référence (Gras et al., 2013a), ce qui signifie que le composé de cette phase a les mêmes modes de vibration que ceux de la phase pure d'a-CPP. La présence des modes de vibration ν_{POP}^{as} et ν_{POP}^s confirme que la phase amorphe synthétisée dans notre étude est essentiellement une phase amorphe de pyrophosphate de calcium hydraté. Une légère augmentation de l'absorbance à 960 cm^{-1} ($\nu_{PO_4}^{as}$) et 1010 cm^{-1} ($\nu_{4PO_4}^{as}$) semble indiquer la présence d'une petite proportion d'orthophosphate de calcium faiblement ou non cristallisé (Somrani et al., 2003)(Combes and Rey, 2010). De plus, la séparation en deux des pics correspondant aux modes de vibration $4 \nu_{PO_3}^{as}$, $\nu_{PO_3}^{as}$ et $\delta_{PO_3} + \rho_{PO_3}$ confirme la présence d'une petite quantité de phase CPPD cristallisé sans avoir la possibilité de clairement identifier laquelle de ces phases (monoclinique ou triclinique) il s'agit à cause de sa faible proportion dans l'échantillon (2 % m/m de m-CPPD évalué par DRX, cf. Tableau II-4). Une analyse complémentaire par spectroscopie Raman a été faite et confirme également ce résultat (données non présentées).

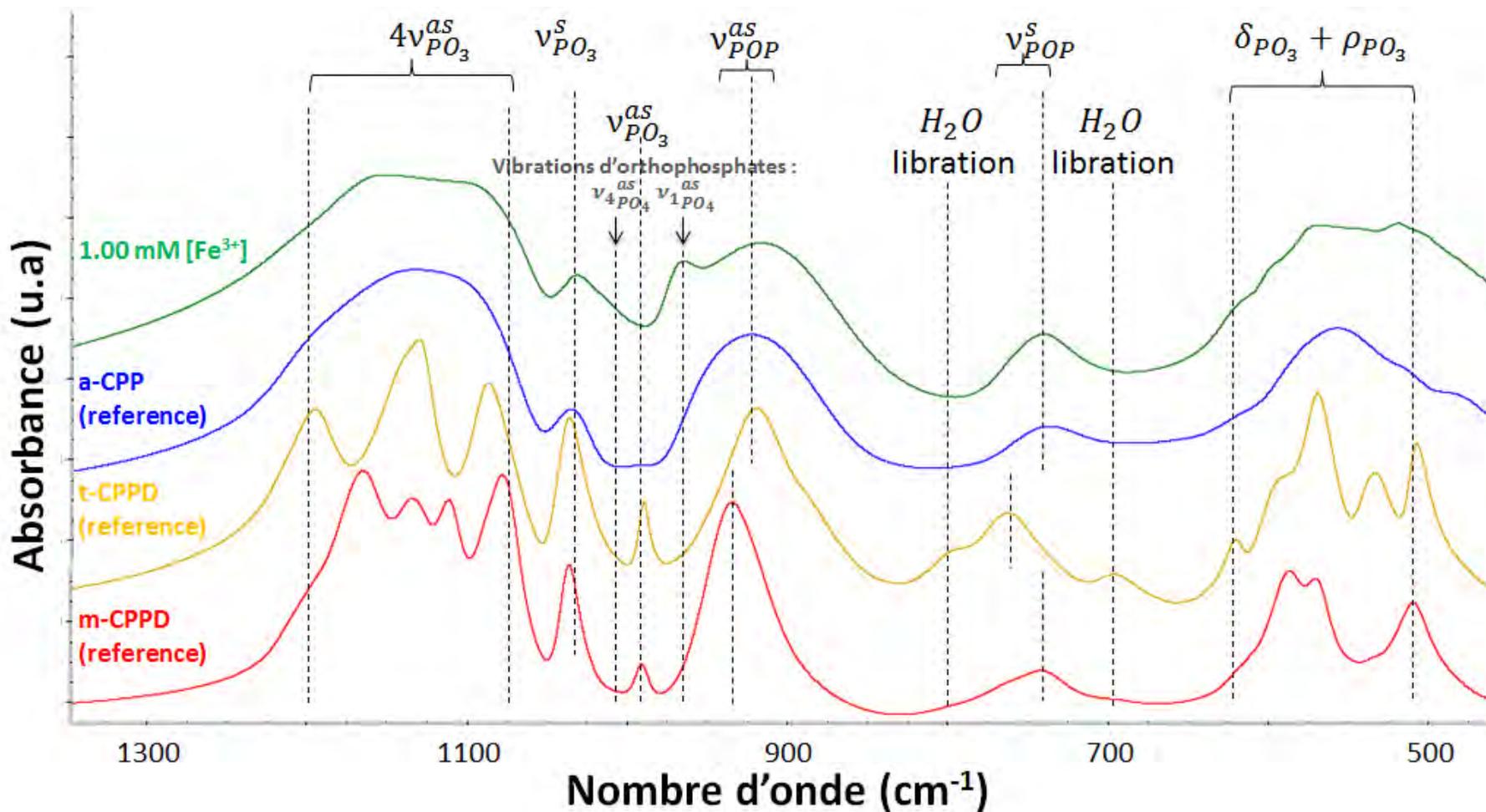


Figure II-8- Spectres FTIR des phases de référence a-CPP, m-CPPD et t-CPPD et de la poudre synthétisée en présence de 1 mM Fe³⁺ initialement introduit dans la solution de réactif cationique (seringue, noté (s) dans le corps du texte). Les différents modes de vibration des molécules « stretching » (ν), « bending » (δ) et « rocking » (ρ), respectivement symétrique (s) ou antisymétrique (as), sont indiqués sur la figure.

II-4-3 Discussion sur l'influence du mode d'introduction de l'additif dans le milieu réactionnel

Nous avons testé les effets de chaque type d'additif ionique sur la précipitation du t-CPPD en l'introduisant dans le milieu de précipitation suivant deux voies :

- Additif (A) initialement présent dans la solution tampon (t) : sa concentration dans le volume du pied de solution initial est donc élevée et diminue au fur et à mesure que la précipitation se déroule puisque le volume total augmente en raison de l'ajout des solutions de réactifs. Le rapport A/Ca ou A/P est donc initialement élevé dans la solution tampon (cas de 1 mM d'additif : avant l'ajout des solutions de réactifs ($V = 0$ mL) $A/Ca = A/P \rightarrow \infty$; à l'ajout de la première goutte ($V = 0,03$ mL) $A/Ca = A/P = 87,96$; ajouts terminés ($V = 100$ mL) $A/Ca = A/P = 0,03$).

- Additif (A) initialement présent dans la seringue (s) de la solution de réactif entraînant son addition progressive dans la solution tampon : sa concentration initiale est donc faible dans le réacteur et augmente au fur et à mesure que la précipitation se déroule mais le rapport A/Ca ou A/P reste constant en considérant que le calcium et le pyrophosphate ajoutés précipitent sous forme de pyrophosphate de calcium hydraté ($Ca_2P_2O_7, nH_2O$) au fur et à mesure des ajouts (cas de 1 mM d'additif : à chaque instant ($0 \text{ mL} < V < 100 \text{ mL}$) $A/Ca = A/P = 0,03$).

Si nous comparons les effets de chaque type d'additif ionique (pour une concentration finale de 1 mM et considérant qu'il n'y a pas eu de co-précipitation de pyrophosphate d'additif), en fonction de la manière dont ils ont été introduits dans le milieu de précipitation (Tableau II-3 et Tableau II-4) et donc de leur concentration dans la solution tampon, les résultats obtenus démontrent que :

a) l'ion $S_2O_3^{2-}$ n'a pas d'effet quelle que soit la manière de l'introduire dans le milieu de précipitation ou la concentration utilisée,

b) l'ion Mg^{2+} est sans effet lorsqu'il est introduit dans une solution de réactif de calcium alors qu'il conduit à la présence d'une quantité mineure de la phase m-CPPD lorsqu'il est initialement présent dans la solution tampon,

c) l'ion Zn^{2+} favorise la formation des phases m-CPPD (1 mM Zn^{2+} : 71 % (s) ou 75 % (t)) et a-CPP (1 mM Zn^{2+} : 25 % (s) ou 20 % (t)) au détriment de la phase t-CPPD (1 mM Zn^{2+} : 4 % (s) ou 5 % (t)) quelle que soit la voie d'introduction de cet additif,

d) l'ion Cu^{2+} favorise également la formation des phases m-CPPD (1 mM Cu^{2+} : 78 % (s) ou 60 % (t)) et a-CPP (1 mM Cu^{2+} : 20 % (s) ou 36 % (t)), au détriment de la phase t-CPPD (1 mM Cu^{2+} : 2 % (s) ou 4 % (t)), mais son effet inhibiteur sur la cristallisation est plus élevé lorsqu'il est initialement présent dans la solution tampon, probablement par un effet dose (concentration plus élevée dès les premiers ajouts $A/\text{Ca} = A/\text{P} = 87,96$ et $0,03$ à la fin),

e) Parmi les additifs ioniques testés, l'ion Fe^{3+} est l'inhibiteur le plus puissant de la cristallisation du t-CPPD puisqu'il conduit à la formation d'a-CPP en tant que phase majeure (1 mM Fe^{3+} : 98 % (s) ou 62 % (t)) avec un peu de phase m-CPPD (1 mM Fe^{3+} : 2 % (s) ou 37 % (t)) ; son introduction dans la solution de réactif de calcium induit un effet d'inhibition totale de la formation de la phase t-CPPD.

Ces résultats montrant un effet plus prononcé de l'additif ionique (dépendant du type d'additif utilisé), selon son mode d'introduction dans le milieu de précipitation, suggère que ces additifs ont des modes d'action différents et pourraient également co-précipiter sous forme de pyrophosphate mixte de calcium et d'additif cationique.

On peut classer les additifs ioniques testés en 3 groupes en fonction de leur effet sur la précipitation de la phase t-CPPD :

- 1) l'ion $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ou Mg^{2+} avec peu ou pas d'effet sur la cristallisation du t-CPPD ;
- 2) les ions Cu^{2+} et Zn^{2+} sont en faveur de la formation de la phase m-CPPD comme phase principale avec un peu d'a-CPP ;
- 3) l'ion Fe^{3+} est en faveur de la formation d'a-CPP. Il est intéressant d'examiner plus particulièrement le cas du fer initialement introduit en faible concentration dans la solution tampon (Tableau II-3) qui a conduit à de petites différences dans la proportion relative de t-CPPD dans l'échantillon synthétisé, comparé à l'échantillon de référence, tandis que son introduction par l'intermédiaire de la solution de réactif de calcium, c'est-à-dire à très faible concentration au début de la précipitation, inhibe complètement la cristallisation du t-CPPD ainsi que celle du m-CPPD. Ces observations dans le cas du Fe^{3+} indiquent que ce n'est pas seulement la concentration en additif qui détermine son effet.

Ces expériences démontrent que la concentration initiale de l'additif et sa distribution dans le réacteur (mode d'introduction) combinées avec le niveau de sursaturation du milieu (Annexe 4 ; *Figure 4-2*), sont des paramètres cruciaux.

En ce qui concerne l'inhibition de la cristallisation du t-CPPD par les ions Fe^{3+} , peut-être qu'il existe une compétition entre la précipitation du pyrophosphate de fer et du pyrophosphate de calcium ou encore que du fer (III) est adsorbé à la surface du cristal de t-

CPPD et bloque certains sites de croissance. Des investigations structurales complémentaires en RMN du solide ainsi que des analyses élémentaires ont été réalisées pour les deux phases t-CPPD et m-CPPD (cf. parties II-4-3-1 et II-6, respectivement) afin de faire la lumière sur les possibles mécanismes d'action de certains de ces additifs.

II-4-3-1 Analyses élémentaires par ICP-OES

Des analyses élémentaires par ICP-OES ont été réalisées sur des échantillons de CPP synthétisés dans les conditions d'obtention de la phase t-CPPD afin d'obtenir des données complémentaires permettant d'élucider le rôle de l'additif ionique (A) dans le contrôle de la précipitation des phases de CPP. Les résultats de ces analyses (rapports molaires A/Ca, A/P, Ca/P, (Ca+A)/P et Ca/(P+A)) sont reportés dans le Tableau II-5.

Quel que soit le mode d'introduction de l'additif ionique (t ou s), les plus basses valeurs de rapport atomique A/Ca et A/P (pour 1 mM Mg^{2+} (s) : $6,7 \cdot 10^{-3}$ et $7,0 \cdot 10^{-3}$, respectivement) sont obtenues pour les CPP précipités en présence de l'ion Mg^{2+} . Ces taux sont aussi les plus faibles pour l'additif anionique $S_2O_3^{2-}$ (A/Ca = $5,8 \cdot 10^{-3}$ et A/P = $5,9 \cdot 10^{-3}$ pour 1,00 mM $S_2O_3^{2-}$ (s)). Ces rapports atomiques varient entre 1,9% et 3,9% dans le cas des autres additifs (cationiques), indiquant un taux d'introduction de l'additif dans l'échantillon assez élevé, notamment 100% pour les cas de 1 mM de Cu^{2+} et de Fe^{3+} introduits dans la solution tampon (t) ou du Zn^{2+} introduit dans la solution de réactif (s). Ces trois poudres sont respectivement composées de 36 %, 62 % et 25 % d'a-CPP ; ces taux d'a-CPP sont parmi les plus forts observés lors de cette étude. En comparant ces taux d'introduction d'additifs, la limite de détection de la méthode de caractérisation (2%) et le pourcentage de phases pures de pyrophosphates d'additif (A/P = 1) qui auraient été obtenues si la totalité des additifs avaient précipité (2,6 ou 4% (molaire) pour les ions respectifs Zn^{2+} , Cu^{2+} et Mg^{2+} ou Fe^{3+}) confirme qu'aucune phase de pyrophosphate d'additif n'a précipité.

Excepté dans le cas du Zn^{2+} pour lequel la différence de composition des échantillons obtenus selon le protocole (t et s) n'est pas significative, il ressort que pour tous les autres additifs les rapports A/Ca et A/P sont les plus élevés lorsque l'additif est introduit dans la solution tampon (t), ce qui correspond aux concentrations initiales en additif les plus fortes (rapports A/Ca ou A/P initialement élevés dans la solution tampon, qui décroissent au cours de la précipitation) (Tableau II-5).

Compte tenu des rayons ioniques des différents additifs cationiques testés (Mg^{2+} (72 pm), Cu^{2+} (73 pm), Fe^{3+} (55 pm) et Zn^{2+} (74 pm)) qui sont tous inférieurs à celui de l'ion Ca^{2+} (100 pm), nous pouvons faire l'hypothèse qu'ils pourraient se comporter de façon similaire à Ca^{2+} lors de la précipitation des CPP et potentiellement se substituer à ce dernier. De plus, aucune variation significative des paramètres de maille n'a été observée par analyses DRX. Cela signifie que les additifs ioniques potentiellement incorporés dans la structure cristallographique, n'ont pas conduit à un changement significatif de la maille cristalline en créant des défauts ou en s'insérant dans des sites interstitiels.

Un rapport Ca/P inférieur à 1 peut être attendu si l'additif cationique s'est incorporé aux CPP précipités. C'est en effet ce qui est observé, excepté pour le cas de 1,00 mM Mg^{2+} ou Fe^{3+} initialement introduit dans la solution de réactif (Tableau II-4). Cette observation peut être expliquée par la faible influence de la présence de 1,00 mM $Mg^{2+}(s)$ sur la composition de l'échantillon (90 % de t-CPPD, 6 % d'a-CPP et 4 % de m-CPPD) comparée à celle de l'échantillon de référence (sans additif : 93 % de t-CPPD et 7 % de a-CPP) conduisant ainsi à l'obtention d'un rapport Ca/P quasi identique dans les deux échantillons ($Ca/P = 1,04$ et $1,03$ respectivement et $(Ca+A)/P = 1,05$ pour 1,00 mM $Mg^{2+}(s)$). A l'inverse, l'effet le plus prononcé sur la cristallisation du m-CPPD est observé en présence de 1 mM de $Fe^{3+}(s)$ (98 % d'a-CPP et 2 % de m-CPPD). Il a été montré qu'une petite quantité d'orthophosphates de calcium peut être associée à la phase a-CPP (Slater et al., 2011), ce qui dans le cas présent pourrait expliquer le rapport Ca/P légèrement supérieur à 1 ($Ca/P = 1,13$) observé dans cet échantillon. Nous verrons cependant, grâce à des analyses RMN de ces échantillons présentées plus loin, qu'ils ne semblent pas contenir d'orthophosphates de calcium. Des analyses complémentaires plus fines pourraient être nécessaires pour définitivement invalider cette hypothèse.

Enfin, dans le cas de l'additif anionique ($S_2O_3^{2-}$), le rapport atomique $Ca/(P+A)$ ne varie pas par rapport au Ca/P avec ou sans additif, ce qui conforte l'hypothèse du peu d'interaction entre cet additif et le pyrophosphate de calcium qui précipite.

Tableau II-5- Rapports atomiques A/Ca, A/P, Ca/P, (Ca+A)/P et Ca/(P+A) calculés à partir des concentrations en Ca, P et additifs (A) déterminées par analyse ICP-OES réalisées sur les poudres synthétisées en présence de l'additif ionique initialement introduit dans la solution de réactif (seringue, (s)) ou dans la solution tampon (t).

Concentration finale de l'additif ionique dans le milieu de précipitation	A/Ca	A/P	Ca/P	(Ca+A)/P	Ca/(P+A)
sans additif (référence)	-	-	1,03 ± 0,03	-	-
1,00 mM [S ₂ O ₃ ²⁻] (s)	(5,8 ± 0,2)·10 ⁻⁰³	(5,9 ± 1,1)·10 ⁻⁰³	1,01 ± 0,14	-	1,01 ± 0,14
5,00 mM [S ₂ O ₃ ²⁻] (s)	(6,0 ± 0,5)·10 ⁻⁰³	(6,4 ± 0,6)·10 ⁻⁰³	1,06 ± 0,06	-	1,06 ± 0,06
1,00 mM [S ₂ O ₃ ²⁻] (t)	(5,9 ± 0,3)·10 ⁻⁰³	(6,2 ± 0,4)·10 ⁻⁰³	1,04 ± 0,10	-	1,03 ± 0,10
1,00 mM [Mg ²⁺] (s)	(6,7 ± 0,6)·10 ⁻⁰³	(7,0 ± 0,6)·10 ⁻⁰³	1,04 ± 0,09	1,05 ± 0,10	-
1,00 mM [Mg ²⁺] (t)	(9,5 ± 2,0)·10 ⁻⁰³	(9,1 ± 1,9)·10 ⁻⁰³	0,95 ± 0,09	0,96 ± 0,10	-
1,00 mM [Fe ³⁺] (s)	(2,7 ± 0,2)·10 ⁻⁰²	(3,1 ± 0,3)·10 ⁻⁰²	1,13 ± 0,08	1,16 ± 0,08	-
1,00 mM [Fe ³⁺] (t)	(4,9 ± 0,4)·10 ⁻⁰²	(3,9 ± 0,5)·10 ⁻⁰²	0,80 ± 0,04	0,84 ± 0,05	-
1,00 mM [Zn ²⁺] (s)	(2,8 ± 0,5)·10 ⁻⁰²	(2,6 ± 0,4)·10 ⁻⁰²	0,95 ± 0,05	0,98 ± 0,06	-
1,00 mM [Zn ²⁺] (t)	(2,8 ± 0,1)·10 ⁻⁰²	(2,6 ± 0,1)·10 ⁻⁰²	0,93 ± 0,05	0,95 ± 0,06	-
1,00 mM [Cu ²⁺] (s)	(2,0 ± 0,3)·10 ⁻⁰²	(1,9 ± 0,3)·10 ⁻⁰²	0,94 ± 0,06	0,96 ± 0,06	-
1,00 mM [Cu ²⁺] (t)	(3,4 ± 0,2)·10 ⁻⁰²	(3,0 ± 0,2)·10 ⁻⁰²	0,90 ± 0,03	0,93 ± 0,03	-

II-4-3-2 Analyses par microscopie électronique à balayage

Les images MEB des poudres de référence a-CPP, t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT β sont présentées sur la Figure II-9. Il s'agit des poudres de référence synthétisées selon les conditions reportées dans le Tableau II-2 et sans additif. Les faciès de cristaux observés pour chaque phase de CPP hydraté sont identiques à ceux précédemment étudiés par Gras *et al.* (Gras et al., 2013a) : les cristaux de la phase m-CPPT β présentent un faciès en plaquette sous forme de lamelles hexagonales (Figure II-9.d) ; les particules d'a-CPP (Figure II-9.a) présentent un faciès relativement sphérique ; les cristaux de t-CPPD (Figure II-9.b) sont constitués des cristaux allongés et parallélépipédiques et ceux de m-CPPD (Figure II-9.c) ont un faciès aciculaire et peuvent se regrouper sous une forme assimilable à des fagots larges aux extrémités et resserrés au centre.

Les images MEB des poudres prises comme référence et celles des poudres synthétisées dans les conditions d'obtention de la phase t-CPPD en présence de différents additifs initialement présents dans la solution tampon (t) ou la seringue de solution de réactif (s) sont présentées sur la Figure II-10. Quel que soit l'additif ionique impliqué, excepté dans le cas du Fe^{3+} qui sera discuté au paragraphe suivant, les cristaux paraissent avoir un faciès aciculaire et présentent une grande hétérogénéité de taille de particules et d'état d'agglomération. En effet, en présence d'additifs, les particules observées sont plus fines par rapport à la morphologie de la phase de référence t-CPPD, présentant des cristaux parallélépipédiques plus épais ; elles présentent une morphologie semblable à des aiguilles caractéristiques de la phase m-CPPD (Figure II-9 (b) et Figure II-10 (a)). Ce faciès allongé est une caractéristique générale des cristaux de CPP dihydratés (Figure II-9 (b) et (c)) précédemment observés dans les travaux de Gras *et al.* (Gras et al., 2013a). Ces observations sont en accord avec le rapport massique m-CPPD/t-CPPD déterminé par diffraction des rayons X qui augmente rapidement avec la concentration en Mg^{2+} , Zn^{2+} , ou Cu^{2+} (Tableau II-3 et Tableau II-4). On remarque aussi que la présence d'ions Zn^{2+} provoque une forte agglomération des particules précipitées (Figure II-10 (e)). Un effet moins prononcé apparaît en présence de Cu^{2+} (Figure II-10 (f)). Ces observations peuvent être liées aux résultats de l'étude semi-quantitative faite à partir des analyses de DRX (Tableau II-3 et Tableau II-4) : en effet, on peut remarquer une forte agglomération en particulier pour les échantillons contenant une forte proportion d'a-CPP, même si cette dernière n'est pas la phase principale constituant ces échantillons (en présence de 1 mM de Zn^{2+} et 1 mM de Cu^{2+} initialement introduits dans la solution tampon).

Le cas des échantillons synthétisés en présence de 1 mM Fe^{3+} est considéré séparément étant donné que la phase a-CPP est majoritaire dans ces échantillons (Tableau II-3 et Tableau II-4). En accord avec les données de DRX, on constate sur la Figure II-10 que la morphologie aciculaire des cristaux de CPPD (Figure II-9) n'est plus visible pour les échantillons synthétisés en présence de 1 mM Fe^{3+} initialement introduit dans la solution de réactif de calcium (s ; 98 % d'a-CPP), tandis qu'un petit nombre de particules à la morphologie aciculaire sont toujours visibles dans les échantillons synthétisés en présence de 1,00 mM de Fe^{3+} initialement introduit dans la solution tampon (t ; 62 % d'a-CPP) (Figure II-10, Tableau II-3 et Tableau II-4). La phase a-CPP (Figure II-10 (b)) observée présente des particules assez bien dispersées, lisses et rondes avec un diamètre d'environ 20 μm . Cette morphologie de phase amorphe de CPP est différente de celle décrite par Gras *et al.* (Gras *et al.*, 2013a) (Figure II-9 ; a), qui est constituée de plus petites particules (inférieures à 1 μm) rondes et agglomérées.

D'autres investigations structurales en utilisant la RMN du solide ont été réalisées pour faire la lumière sur le mécanisme d'action possible de certains de ces additifs ioniques.

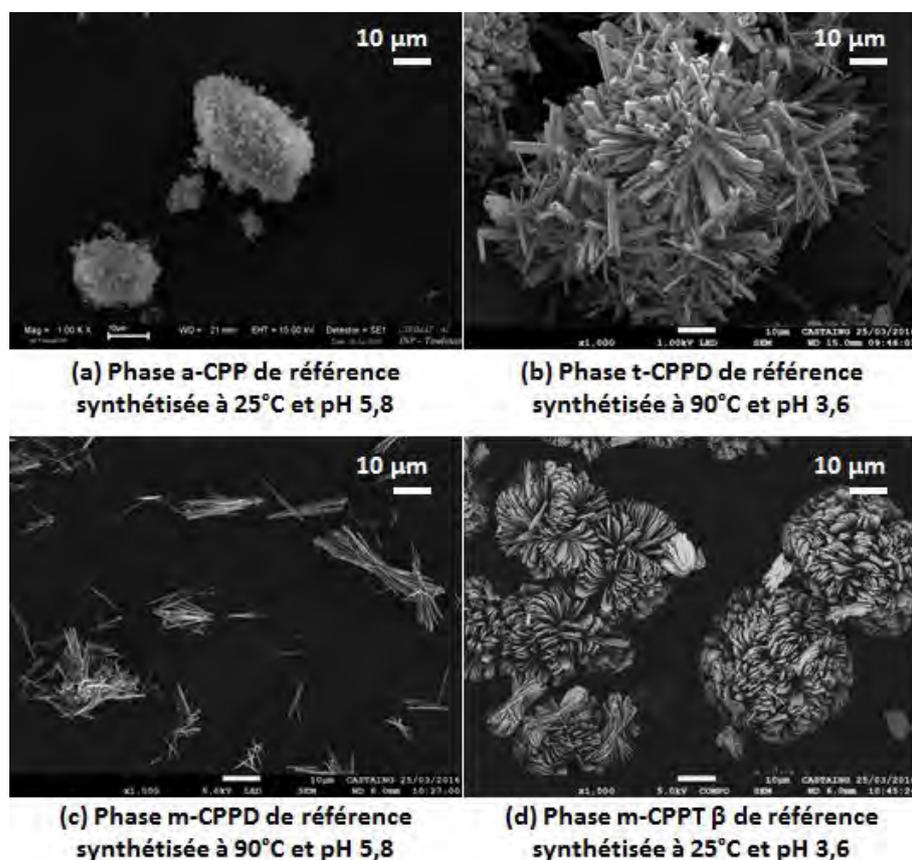


Figure II-9– Images MEB des poudres de référence des phases a-CPP (a), t-CPPD (b), m-CPPD (c) et m-CPPT β (d).

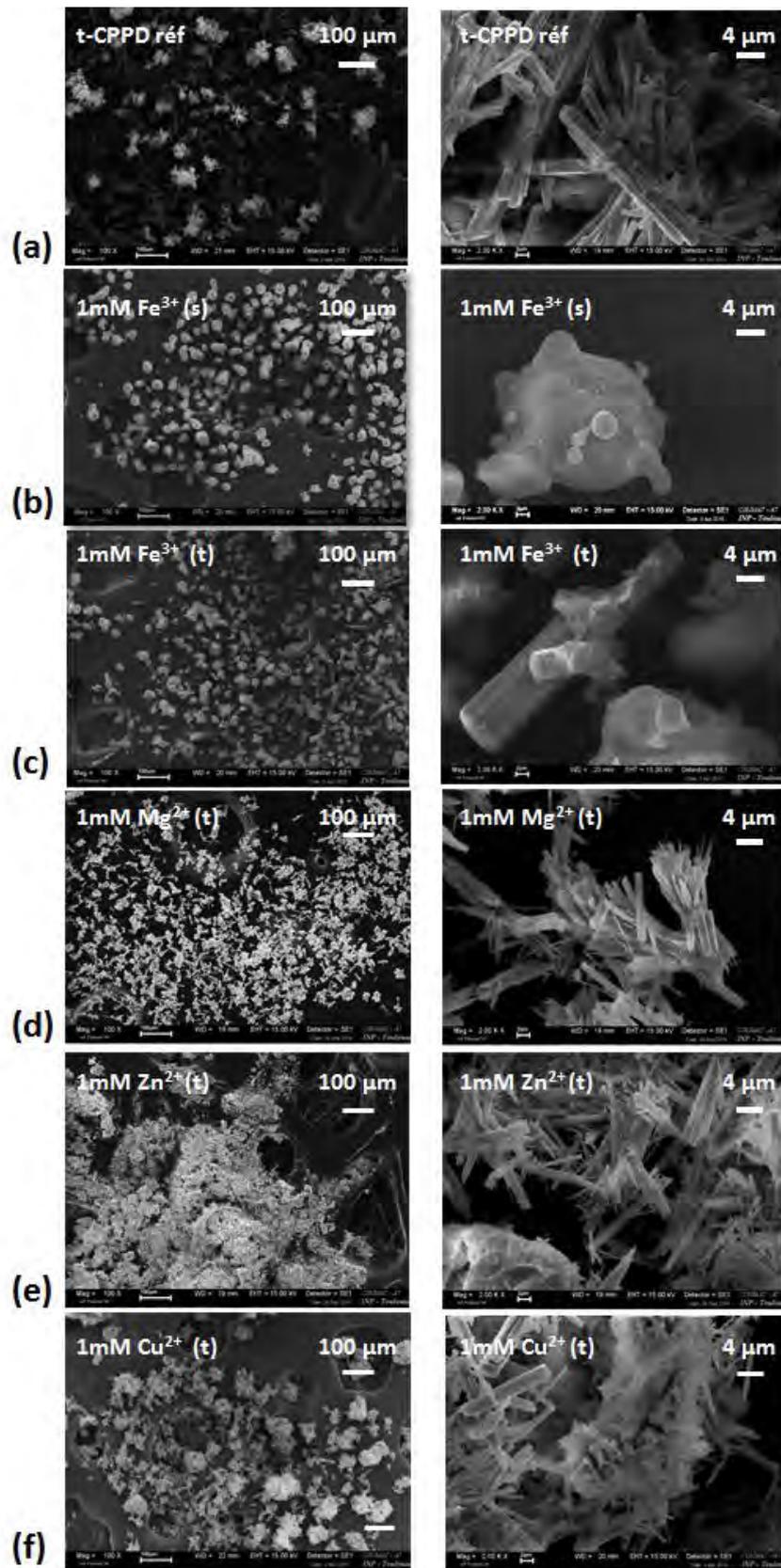


Figure II-10 – Images MEB de la poudre de *t*-CPPD de référence (a) et des poudres synthétisées dans les conditions d'obtention de la phase *t*-CPPD en présence 1 mM Fe^{3+} (b) ou (c), respectivement introduit dans la seringue de solution de réactif cationique (s) ou dans la solution tampon (t), ou de 1 mM Mg^{2+} (d), 1 mM Zn^{2+} (e) ou 1 mM Cu^{2+} (f) introduits dans la solution tampon (t).

II-5 Influence d'additifs ioniques sur la précipitation de la phase m-CPPD en conditions contrôlées

II-5-1 Additif initialement présent dans la solution tampon : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX

La même démarche que précédemment est reprise ici pour la phase m-CPPD. La méthode de synthèse mise au point en réacteur agité a permis d'obtenir une poudre majoritairement constituée de la phase m-CPPD (par comparaison avec les données de référence (Gras et al., 2016b)) dans les conditions de pH (5,8) et température (90°C) choisies. Les diffractogrammes de RX de la phase prise comme référence dans cette étude (m-CPPD synthétisé en l'absence d'additif) ainsi que le produit des synthèses réalisées dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPD en présence de 1 mM Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} ou $S_2O_3^{2-}$ initialement ajoutés dans la solution tampon (t) sont présentés sur la Figure II-11. Suite à l'examen des diffractogrammes de RX des échantillons synthétisés en présence d'un additif ionique, on note qu'ils sont constitués de CPP dihydratés : m-CPPD, t-CPPD ou d'un mélange de ces deux phases cristallisées.

Les diagrammes DRX de la poudre de référence (sans additif) et des poudres obtenues en présence d'additifs ioniques présentent le pic de Bragg (110) caractéristique de la phase m-CPPD à $2\theta = 12,01 \pm 0,02^\circ$ (Gras et al., 2016b) ainsi que deux pics additionnels très peu intenses à $2\theta = 10,95^\circ \pm 0,02$ et $12,58^\circ \pm 0,02$ caractéristiques de la phase t-CPPD (pics de Bragg 010 et 100 respectivement). Comme indiqué au paragraphe II-3-3 la poudre de référence (sans additif) est composée à 85% de m-CPPD, 5% de t-CPPD et 10% d'a-CPP. Ces deux derniers pics de diffraction sont en particulier d'intensité relative plus faible pour l'échantillon synthétisé en présence de Fe^{3+} par rapport à la poudre de référence mais également par rapport aux échantillons synthétisés en présence des autres additifs ioniques. Cette observation conduit à penser que la présence de Fe^{3+} a, dans ce cas, inhibé la cristallisation du peu de t-CPPD présent dans l'échantillon de référence (synthétisé sans additif).

En agrandissant les diagrammes DRX autour de $2\theta = 30^\circ$ un léger halo diffus devient distinct en particulier dans le cas du Cu^{2+} et du Mg^{2+} . Ce halo est plus visible sur la Figure II-12 qui présente les diffractogrammes RX entre 10° et 50° des poudres synthétisées en présence de 1 mM Cu^{2+} ou Mg^{2+} . Ce halo diffus est caractéristique de la présence d'une

certaine proportion de phase amorphe dans les échantillons. Il est également présent sur les diffractogrammes RX des autres échantillons (m-CPPD de référence synthétisé en absence d'additif et poudres synthétisées en présence d'autres additifs) mais l'empilement de plusieurs diffractogrammes RX sur la Figure II-11 rend ce halo difficile à distinguer avec ce mode de représentation.

Comme déjà discuté dans le cas du t-CPPD dans la partie II-4-1, si on considérait que la totalité des ions d'additifs (A) respectivement impliqués dans les synthèses de m-CPPD ait précipité sous forme de sel de pyrophosphate d'additif, les pourcentages massiques de pyrophosphate d'additif attendus seraient au-delà du seuil de détection de la méthode DRX (2%). Cette technique d'analyse a donc permis de montrer qu'aucune phase cristallisée de pyrophosphate de magnésium, de zinc, de cuivre ou de fer n'a précipité en quantité au-delà du seuil de détection. De plus, les paramètres de maille calculés à partir des diagrammes DRX ont été attentivement vérifiés et ils ne montrent pas de différences significatives avec les paramètres de maille des composés de référence publiés (Gras et al., 2013a).

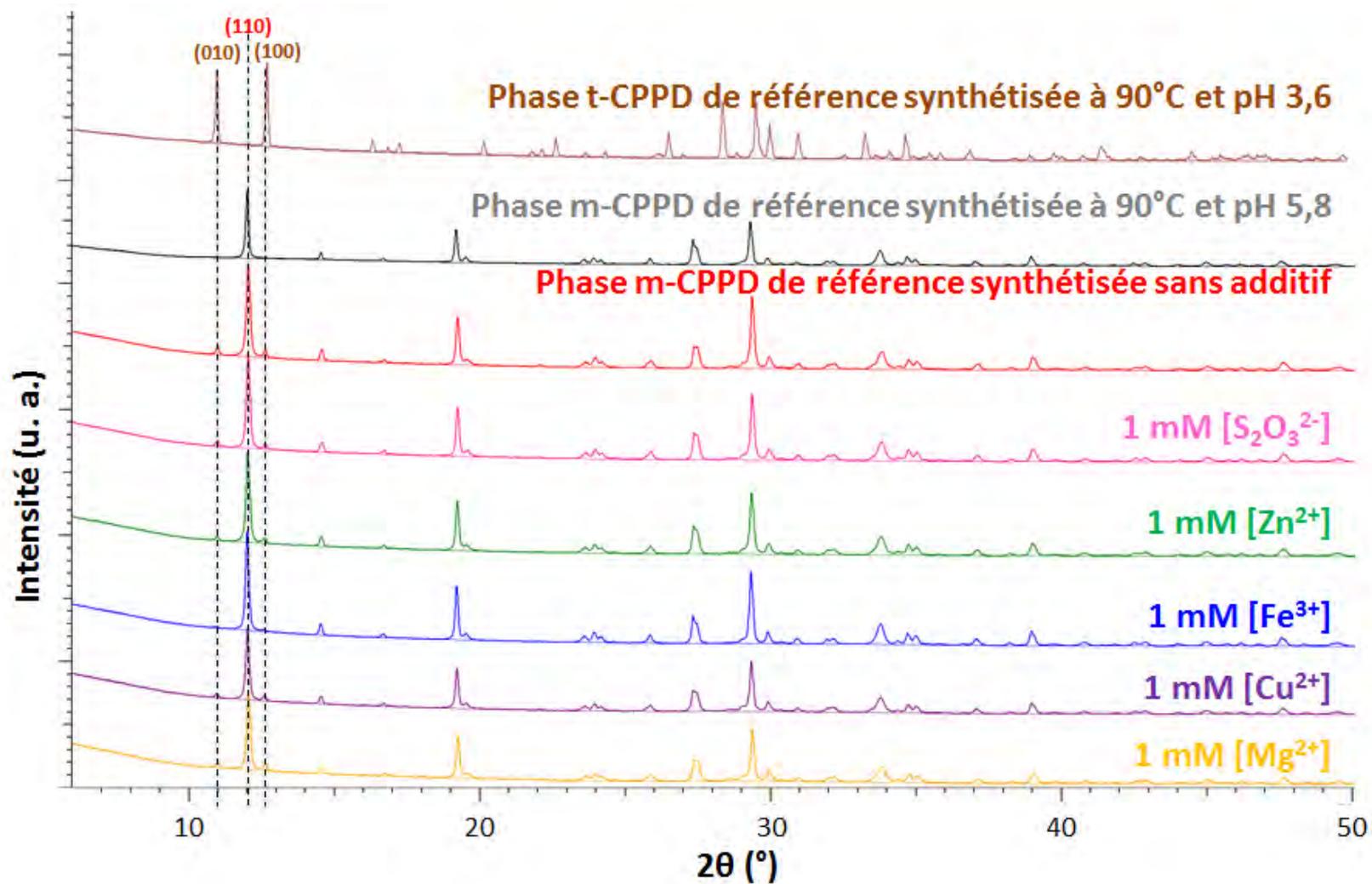


Figure II-11 - Diagrammes DRX de la phase m-CPPD de référence (sans additif), d'une phase m-CPPD pure et des poudres synthétisées en présence de chaque additif ionique (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , $S_2O_3^{2-}$) initialement présent dans la solution tampon(t) et conduisant à l'obtention d'une concentration en additif de 1 mM à la fin de la synthèse.

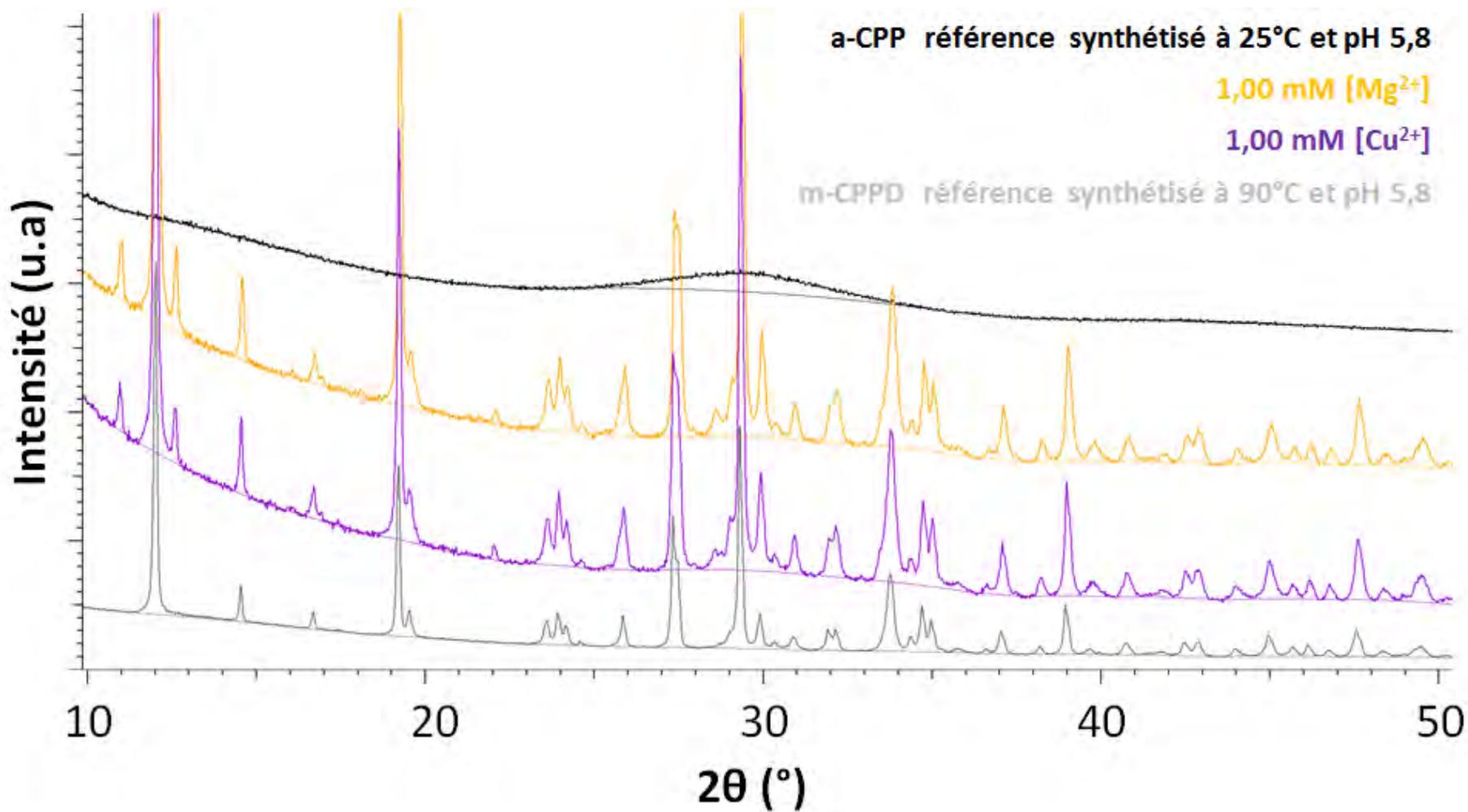


Figure II-12 Diagrammes DRX de la phase α -CPP de référence, d'une phase m-CPPD pure et des poudres synthétisées en présence de 1 mM Cu^{2+} ou Mg^{2+} initialement présent dans la solution tampon et conduisant à l'obtention d'une concentration en additif de 1 mM à la fin de la synthèse.

Suite à ces premières observations qualitatives, nous avons réalisé une étude semi-quantitative à partir des résultats de DRX (cf. Annexe n°2) afin de déterminer les proportions massiques relatives des phases m-CPPD, t-CPPD et a-CPP contenues dans les échantillons synthétisés (Tableau II-6). Il apparaît que la poudre de référence synthétisée sans additif n'est pas totalement pure et qu'elle comporte une petite proportion de phase amorphe (10 % m/m) et de phase t-CPPD (5 % m/m). En outre, la présence de 9 à 22 % m/m de phase amorphe dans les échantillons synthétisés en présence d'un additif (Tableau II.4) confirme les observations concernant la présence d'un halo diffus sur les diagrammes DRX (Figure II-11 et Figure II-12).

On note que la proportion massique relative de phase amorphe égale à $10\% \pm 1\%$ pour le m-CPPD synthétisé sans additif double lorsqu'il est préparé en présence de 1 mM de Mg^{2+} ou Cu^{2+} (respectivement $18\% \pm 1\%$ et $22\% \pm 1\%$) au détriment du pourcentage relatif de m-CPPD égal à $85 \pm 1\%$ (synthèse sans additif) qui diminue respectivement jusqu'à $76 \pm 1\%$ et $73 \pm 1\%$ (Tableau II-6). Les proportions de phases constituants les CPP synthétisés en présence de 1 mM $S_2O_3^{2-}$ (t) ou Zn^{2+} ne varient pas de plus de 1 ou 2 % m/m ce qui nous indique que ces ions dans la gamme de concentration testée, n'ont pas d'influence sur la formation de la phase m-CPPD. Enfin la proportion en m-CPPD dans l'échantillon synthétisé en présence de 1 mM Fe^{3+} augmente légèrement ($88\% \text{ m/m}$) au détriment de la proportion en t-CPPD ($1\% \text{ m/m}$).

Ces résultats montrent l'effet majeur qu'ont les ions Cu^{2+} , Mg^{2+} et Fe^{3+} sur la cristallisation de la phase m-CPPD.

D'autres investigations structurales présentées dans la partie II-6 ont été réalisées par RMN du solide du ^{31}P afin d'obtenir des informations complémentaires sur les phases qui ont précipité en présence d'additifs.

Tableau II-6 - Pourcentage massique relatif des différentes phases de CPP (m-CPPD, t-CPPD et a-CPP) présentes dans les échantillons synthétisés en présence ou non d'un additif ionique initialement présent dans la solution tampon (t). Toutes les expériences ont été dupliquées.

Concentration finale en additif ionique dans le milieu de précipitation	m-CPPD (% m/m)	t-CPPD (% m/m)	a-CPP (% m/m)
Sans additif (référence)	85 ± 1	5 ± 1	10 ± 1
1,00 mM [$S_2O_3^{2-}$]	86 ± 1	5 ± 1	9 ± 1
1,00 mM [Mg^{2+}]	76 ± 1	7 ± 1	18 ± 1
1,00 mM [Fe^{3+}]	88 ± 1	1 ± 1	11 ± 1
1,00 mM [Zn^{2+}]	87 ± 1	4 ± 1	9 ± 1
1,00 mM [Cu^{2+}]	73 ± 1	5 ± 1	22 ± 1

II-5-2 Additif initialement présent dans l'une des deux solutions de réactifs (seringue) : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX

La Figure II-13 présente les diagrammes DRX des échantillons de CPP synthétisés dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPD en présence de 1 mM d'additif ionique initialement introduit selon le protocole (s). Dans une première approche d'analyse qualitative (Figure II-13), il apparaît que quel que soit l'additif ionique mis en jeu lors des synthèses, les échantillons obtenus sont majoritairement composés de m-CPPD.

Les diagrammes DRX réalisés sur la poudre de référence (sans additif) et les poudres obtenues en présence d'additifs ioniques présentent le pic de Bragg (110) caractéristique de la phase m-CPPD à $2\theta = 12,01 \pm 0,02^\circ$ (Gras et al., 2016b). Seuls les diagrammes DRX réalisés sur la poudre de référence (sans additif) et la poudre obtenue en présence d'ions $S_2O_3^{2-}$ présentent deux pics additionnels très peu intenses à $2\theta = 10,95^\circ \pm 0,02$ et $12,58^\circ \pm 0,02$ caractéristiques de la phase t-CPPD (pics de Bragg respectif 010 et 100).

En outre, il n'y a pas de phases cristallines de pyrophosphates de magnésium, zinc, cuivre ou fer ayant co-précipitées. En effet, comme indiqué précédemment pour les échantillons de t-CPPD et de m-CPPD précipités à l'aide du protocole (t), compte tenu de la limite de détection (2%) pour les analyses par DRX, si ces phases de pyrophosphate d'additif avaient été présentes dans les échantillons, elles auraient été détectables.

D'autre part, un halo diffus caractéristique de la présence de phase amorphe est légèrement visible autour de $2\theta = 30^\circ$ sur les diagrammes DRX des échantillons synthétisés en présence de 1 mM d'additif (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{3+}). La Figure II-14 présente les diagrammes DRX des phases pures d'a-CPP et m-CPPD ainsi que celui de la poudre synthétisée en présence de 1 mM Fe^{3+} (s) : la présence du halo diffus sur cette figure ne comportant que quatre diffractogrammes RX est alors bien visible.

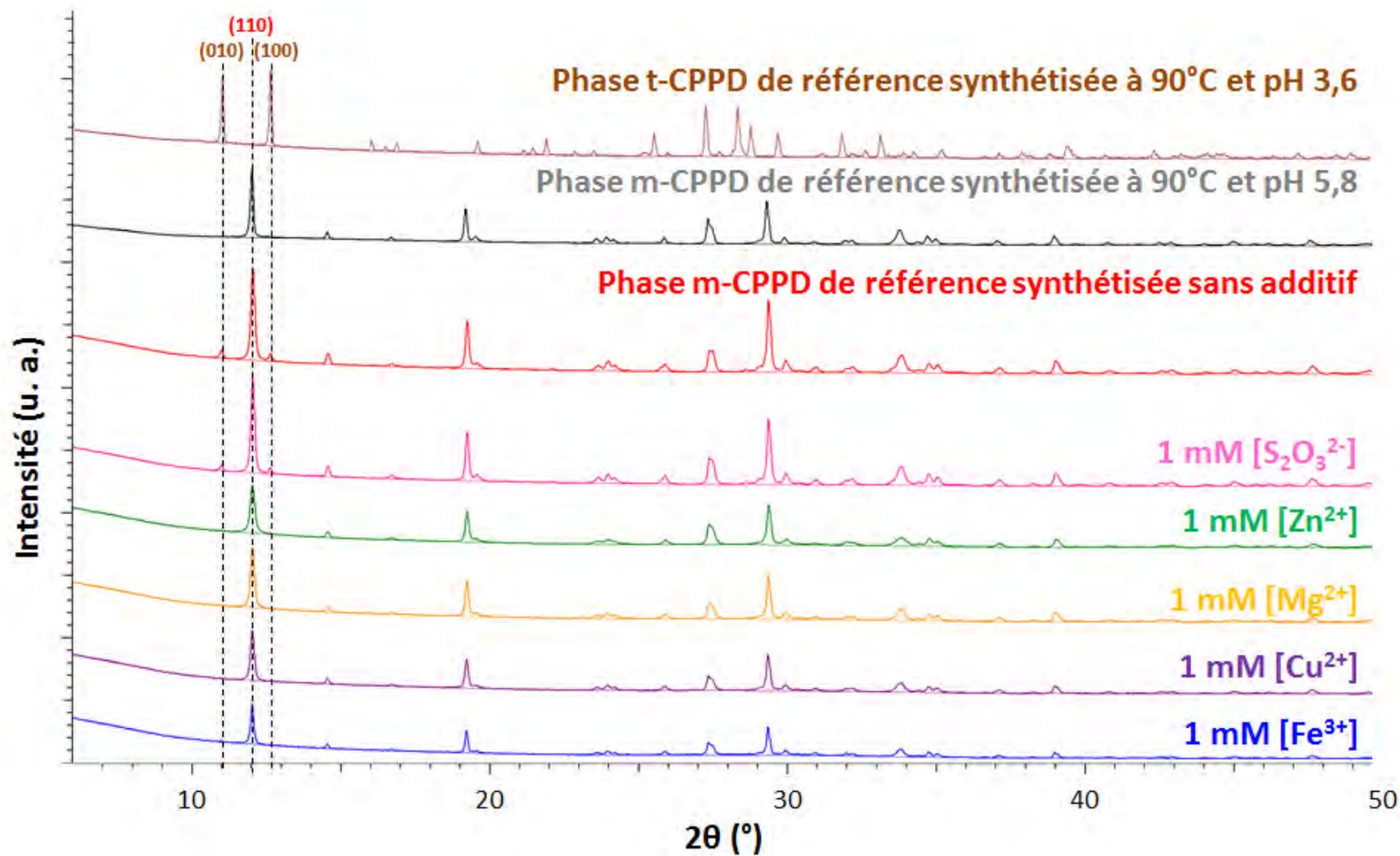


Figure II-13 - Diagrammes DRX de la phase m-CPPD de référence (sans additif), d'une phase m-CPPD pure et des poudres synthétisées en présence de chaque additif ionique (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , $S_2O_3^{2-}$) initialement présent dans une solution de réactif (s) et conduisant à l'obtention d'une concentration en additif de 1 mM à la fin de la synthèse.

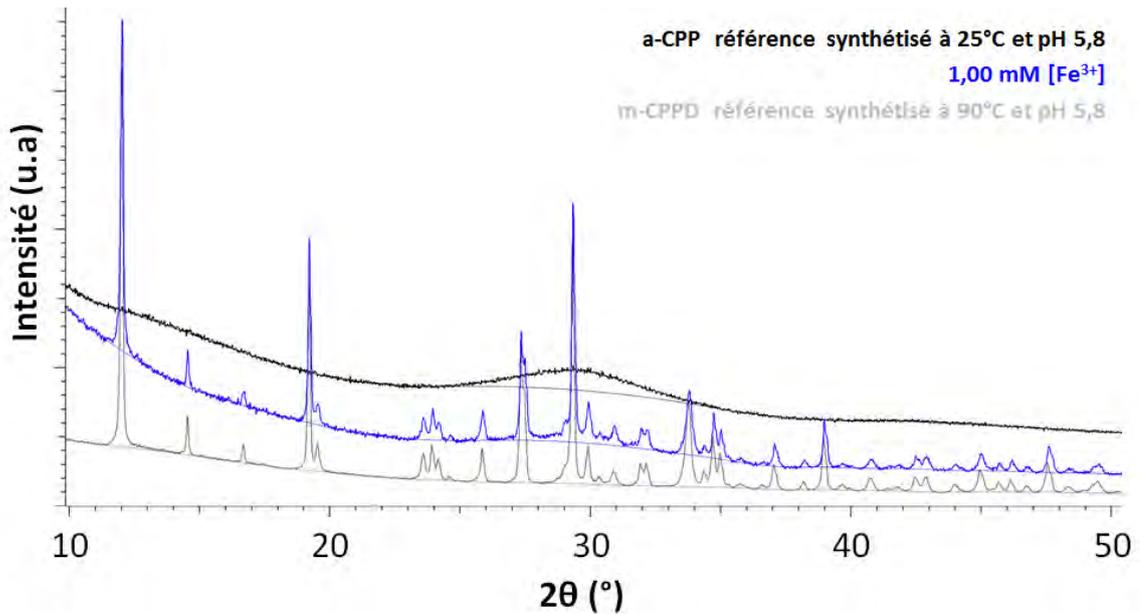


Figure II-14- Diagrammes DRX de la phase a-CPP de référence, d'une phase m-CPPD pure et de la poudre synthétisée en présence de 1 mM Fe³⁺ initialement présent dans la solution de réactif cationique (s) et conduisant à l'obtention d'une concentration en additif de 1 mM à la fin de la synthèse.

Les résultats de l'étude semi-quantitative réalisée à partir des diagrammes DRX présentés sur la Figure II-13 sont reportés dans le Tableau II-7. Nous pouvons remarquer que la présence de 1 mM d'ions S₂O₃²⁻ lors de la synthèse n'entraîne pas de changement significatif dans la composition de l'échantillon obtenu (m-CPPD (87%), t-CPPD (4%) et a-CPP (9%)) par rapport à la composition de la poudre de référence. En outre, les résultats mettent en évidence l'effet déterminant de la présence de 1 mM d'ions Mg²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺ ou Cu²⁺ sur la composition des poudres synthétisées : la présence de 26% à 45% d'a-CPP et l'absence de t-CPPD (0%) dans les poudres synthétisées en présence de Mg²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺ et Cu²⁺ (protocole (s)) signifient que ces ions inhibent la cristallisation de la phase m-CPPD et du peu de t-CPPD normalement présent dans l'échantillon pris comme référence (5%).

Tableau II-7 - Pourcentage massique relatif des différentes phases de CPP (m-CPPD, t-CPPD et a-CPP) présentes dans les échantillons synthétisés en présence ou non d'un additif ionique initialement introduit dans la solution de réactif (s). Toutes les expériences ont été dupliquées.

Concentration finale en additif ionique dans le milieu de précipitation	m-CPPD (% m/m)	t-CPPD (% m/m)	a-CPP (% m/m)
Sans additif (référence)	85 ± 1	5 ± 1	10 ± 1
1,00 mM [S ₂ O ₃ ²⁻]	87 ± 1	4 ± 1	9 ± 1
1,00 mM [Mg ²⁺]	73 ± 1	0 ± 1	27 ± 1
1,00 mM [Fe ³⁺]	55 ± 1	0 ± 1	45 ± 1
1,00 mM [Zn ²⁺]	74 ± 1	0 ± 1	26 ± 1
1,00 mM [Cu ²⁺]	67 ± 1	0 ± 1	33 ± 1

II-5-3 Discussion sur l'influence du mode d'introduction de l'additif

Comme précédemment détaillé dans le cas du t-CPPD (partie II-4), nous avons testé les effets de chaque type d'additif ionique sur la précipitation du m-CPPD en l'introduisant dans le milieu de précipitation suivant deux voies :

- Additif (A) initialement présent dans la solution tampon impliquant un rapport A/Ca ou A/P initialement élevé dans la solution tampon
- Additif (A) initialement présent dans la seringue de la solution de réactif, ajoutée progressivement dans le milieu de précipitation, et impliquant donc une concentration initiale faible dans le réacteur ainsi qu'un rapport A/Ca ou A/P qui reste constant

Si nous comparons les effets de chaque type d'additif ionique (pour une concentration finale de 1 mM et considérant qu'il n'y a pas eu de co-précipitation), en fonction de la manière dont ils ont été introduits dans le milieu de précipitation (Tableau II-6 et Tableau II-7) et donc de leur concentration dans la solution tampon, les résultats obtenus montrent que :

a) l'ion S₂O₃²⁻ n'a pas d'effet quelle que soit la manière de l'introduire dans le milieu de précipitation ou la concentration utilisée,

b) l'ion Mg²⁺ est un inhibiteur de la cristallisation du m-CPPD puisqu'il conduit à la formation d'a-CPP (18% (t) et 27% (s)). Son action inhibitrice est plus puissante lorsqu'il est introduit dans la solution de réactif cationique que lorsqu'il est initialement présent dans la solution tampon,

c) l'ion Zn^{2+} est sans effet lorsqu'il est introduit dans la solution de réactif de calcium alors qu'il conduit à la présence d'une quantité non négligeable de phase amorphe lorsqu'il est initialement présent dans la solution tampon (26%),

d) l'ion Cu^{2+} est un inhibiteur de la cristallisation du m-CPPD puisqu'il conduit à la formation d'a-CPP (22% (t) et 33% (s)). Son action inhibitrice est plus importante lorsqu'il est introduit dans la solution de réactif (s) que lorsqu'il est initialement présent dans la solution tampon (t),

e) l'ion Fe^{3+} est sans effet lorsqu'il est introduit dans une solution de réactif de calcium et conduit à la présence d'une quantité importante de phase amorphe lorsqu'il est initialement présent dans la solution tampon (45%) qui fait de lui dans le cas du protocole (s) l'inhibiteur le plus puissant de la cristallisation du m-CPPD,

Au regard de ces résultats, on peut classer les additifs ioniques étudiés principalement en deux groupes en fonction de leur effet sur la précipitation de la phase m-CPPD :

- 1) l'ion $S_2O_3^{2-}$ est sans d'effet sur la cristallisation du m-CPPD ;
- 2) les ions Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} et Cu^{2+} , sont peu ou fortement inhibiteurs de la formation de la phase m-CPPD selon leur mode d'introduction (protocole (s) ou (t)).

Ces expériences démontrent que la distribution de l'additif dans le réacteur (mode d'introduction) est comme dans le cas de l'étude de la précipitation de t-CPPD en présence d'additifs ioniques un paramètre crucial.

Des investigations structurales complémentaires en RMN du solide seront présentées pour les deux phases t-CPPD et m-CPPD au paragraphe II-6 afin de faire la lumière sur les possibles mécanismes d'action de certains de ces additifs.

II-5-3-1 Analyses élémentaires complémentaires par ICP-OES

Des analyses élémentaires par ICP-OES ont été réalisées sur des échantillons de poudres synthétisées dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPD afin d'obtenir des données complémentaires permettant d'élucider le rôle de l'additif ionique (A) dans le contrôle de la précipitation de la phase m-CPPD. Les résultats de ces analyses (rapports molaires A/Ca, A/P, Ca/P, (Ca+A)/P et Ca/(P+A)) sont reportés dans le Tableau II-11.

Quel que soit le mode d'introduction de l'additif ionique (t ou s), les plus basses valeurs de rapport atomique A/Ca et A/P sont obtenues pour les CPP précipités en présence de l'ion $S_2O_3^{2-}$ (pour 1 mM $S_2O_3^{2-}$ (s) : $5,64 \cdot 10^{-3}$ et $5,59 \cdot 10^{-3}$ et 1 mM $S_2O_3^{2-}$ (t) : $5,53 \cdot 10^{-3}$ et $5,47 \cdot 10^{-3}$

respectivement). Elles varient entre 0,9% et 3,2% dans le cas des autres additifs (cationiques), indiquant un taux d'introduction de l'additif dans l'échantillon assez élevé, notamment 100% pour les cas de 1 mM de Cu^{2+} ou de Mg^{2+} introduit dans la solution tampon. Ces deux poudres sont respectivement composées de 22 % m/m et 18 % m/m d'a-CPP, les plus fortes proportions d'a-CPP observées lors de cette étude (protocole t).

Dans le cas du Cu^{2+} et du Mg^{2+} , les rapports A/Ca et A/P sont très proches quel que soit le protocole considéré (t ou s). Dans les cas du Zn^{2+} et du Fe^{3+} , les rapports A/Ca et A/P sont les plus élevés lorsque l'additif est introduit dans la solution tampon (t), ce qui correspond aux concentrations initiales en additif les plus fortes (rapports A/Ca ou A/P initialement élevés dans la solution tampon, qui décroissent au cours de la précipitation) (Tableau II-8). C'est aussi pour ces ions que la différence de composition des échantillons obtenus selon le protocole (t ou s) est la plus significative (Tableau II-6 et Tableau II-7). Notons que comme dans le cas du t-CPPD aucune variation significative de leurs paramètres de maille n'a été observée par DRX. Un rapport Ca/P inférieur à 1 peut être attendu si l'additif ionique s'est incorporé aux CPP précipités. C'est en effet ce qui est observé, excepté pour le cas de 1,00 mM Zn^{2+} initialement introduit dans la solution tampon (Tableau II-8). Cette observation peut être expliquée par la faible influence de la présence de 1,00 mM Zn^{2+} (t) sur la composition de l'échantillon (87% de m-CPPD, 4 % de t-CPPD et 9 % d'a-CPP) comparée à celle de l'échantillon de référence (sans additif : 85 % de m-CPPD, 5 % de t-CPPD et 10 % d'a-CPP) conduisant ainsi à l'obtention d'un rapport Ca/P similaire dans les deux échantillons (respectivement 0,99 et 0,98). A l'inverse, l'effet le plus prononcé sur la cristallisation du m-CPPD est observé en présence de 1 mM de Fe^{3+} (s) (45 % d'a-CPP et 55 % de m-CPPD).

Tableau II-8- Rapports atomiques A/Ca, A/P, Ca/P, (Ca+A)/P et Ca/(P+A) calculés à partir des concentrations en Ca, P et additif (A) déterminées par analyse ICP-OES réalisées sur les poudres synthétisées en présence de l'additif ionique initialement introduit dans la solution de réactif (s) ou dans la solution tampon (t).

Concentration finale d'additif dans le milieu de précipitation	A/Ca	A/P	Ca/P	(Ca+A)/P	Ca/(P+A)
sans additif (référence)	-	-	0,98 ± 0,03	-	-
1,00 mM [S ₂ O ₃ ²⁻] (s)	(5,64 ± 0,13)·10 ⁻⁰³	(5,59 ± 0,18)·10 ⁻⁰³	0,99 ± 0,03	-	0,99 ± 0,03
1,00 mM [S ₂ O ₃ ²⁻] (t)	(5,53 ± 0,09)·10 ⁻⁰³	(5,47 ± 0,14)·10 ⁻⁰³	0,99 ± 0,03	-	0,98 ± 0,03
1,00 mM [Mg ²⁺] (s)	(1,86 ± 0,02)·10 ⁻⁰²	(1,74 ± 0,05)·10 ⁻⁰²	0,94 ± 0,02	0,95 ± 0,02	-
1,00 mM [Mg ²⁺] (t)	(3,07 ± 0,07)·10 ⁻⁰²	(2,86 ± 0,09)·10 ⁻⁰²	0,93 ± 0,03	0,96 ± 0,03	-
1,00 mM [Fe ³⁺] (s)	(2,99 ± 0,03)·10 ⁻⁰²	(2,71 ± 0,06)·10 ⁻⁰²	0,91 ± 0,02	0,93 ± 0,02	-
1,00 mM [Fe ³⁺] (t)	(2,68 ± 0,01)·10 ⁻⁰²	(2,57 ± 0,02)·10 ⁻⁰²	0,96 ± 0,01	0,98 ± 0,01	-
1,00 mM [Zn ²⁺] (s)	(2,55 ± 0,06)·10 ⁻⁰²	(2,35 ± 0,03)·10 ⁻⁰²	0,92 ± 0,01	0,94 ± 0,02	-
1,00 mM [Zn ²⁺] (t)	(9,07 ± 0,13)·10 ⁻⁰³	(8,97 ± 0,18)·10 ⁻⁰³	0,99 ± 0,02	1,00 ± 0,02	-
1,00 mM [Cu ²⁺] (s)	(2,43 ± 0,03)·10 ⁻⁰²	(2,18 ± 0,05)·10 ⁻⁰²	0,90 ± 0,03	0,92 ± 0,03	-
1,00 mM [Cu ²⁺] (t)	(3,20 ± 0,05)·10 ⁻⁰²	(2,94 ± 0,05)·10 ⁻⁰²	0,92 ± 0,03	0,95 ± 0,03	-

II-5-3-2 Analyses complémentaires par microscopie électronique à balayage

Les images MEB de la poudre de référence (synthétisée sans additif) et celles des poudres synthétisées en présence d'ions Mg^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{3+} initialement présents dans la solution tampon (t) ou la seringue de solution de réactif cationique (s) ou d'ion Zn^{2+} (s) sont présentées sur la Figure II-15. Dans cette figure, nous n'avons sélectionné que les clichés MEB correspondant aux poudres présentant une différence de composition avec la phase prise comme référence dans cette étude. Quel que soit l'additif ionique impliqué, des cristaux au faciès aciculaire caractéristique de la phase m-CPPD (Figure II-15 et Figure II-9) sont présents et partiellement ou presque totalement recouverts d'une phase aux particules relativement sphériques et de petite taille, caractéristiques de la phase a-CPP (Figure II-9). Les agglomérats formés en présence d'ions introduits dans la solution de réactif, ont une grande hétérogénéité de taille et l'état d'agglomération est globalement plus présent. Cette observation peut être liée aux résultats de l'étude semi-quantitative faite à partir des analyses de DRX (Tableau II-6 et Tableau II-7). Plus la proportion massique relative d' a-CPP dans l'échantillon est élevée (26 %, 27 %, 33 % et 45 % respectivement pour 1 mM Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} ou Fe^{3+} (s)), plus la poudre obtenue présente de gros agglomérats de cristaux de m-CPPD fortement recouverts d'a-CPP. En conclusion, tout comme dans l'étude faite sur la cristallisation de la phase t-CPPD en présence d'additifs ioniques, une forte agglomération est visible pour les échantillons contenant une forte proportion d'a-CPP même si cette dernière n'est pas la phase principale constituant ces échantillons.

D'autres investigations structurales en utilisant la RMN du solide ont été réalisées pour faire la lumière sur le mécanisme d'action possible de certains de ces additifs ioniques.

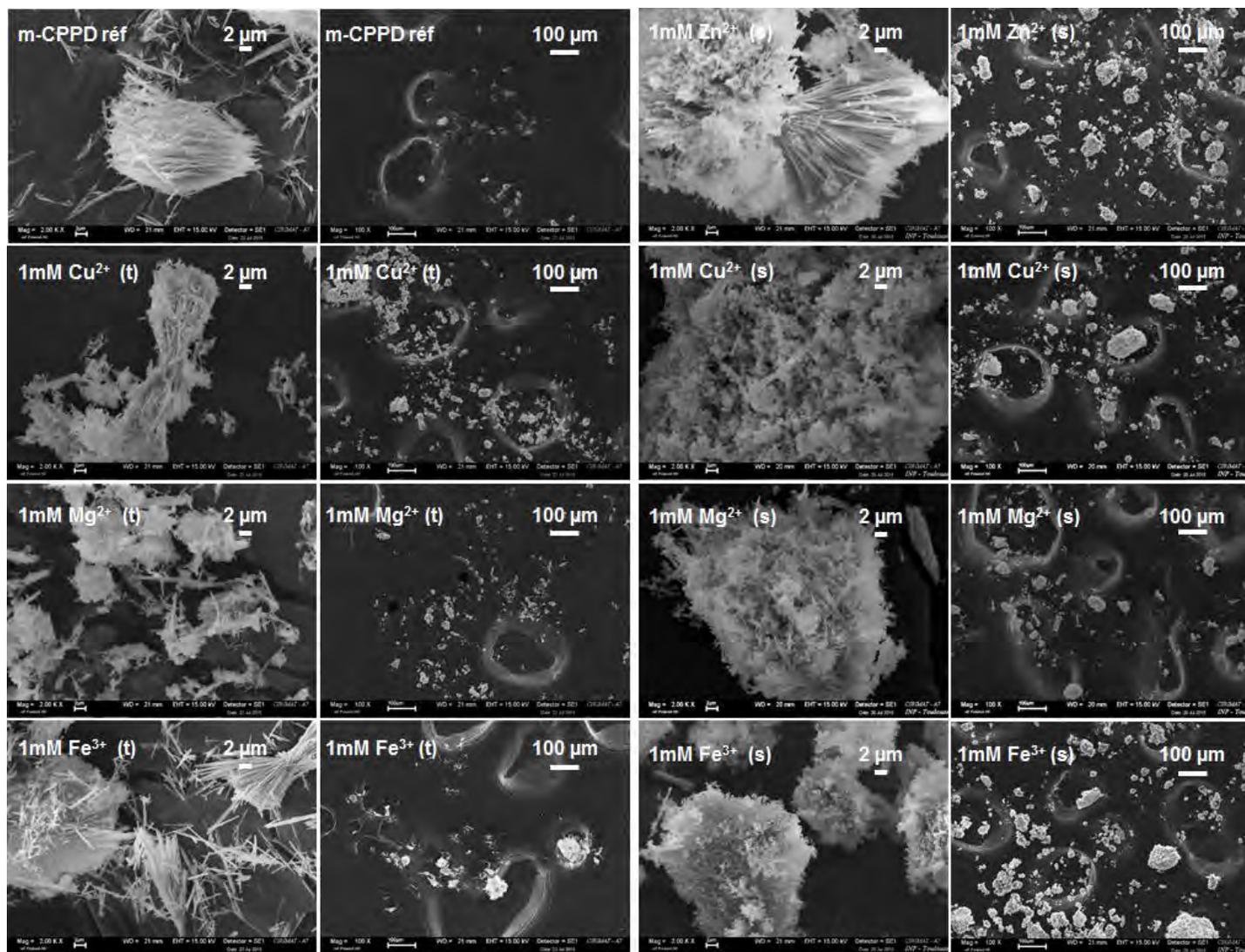


Figure II-15- Images MEB du m-CPPD de référence (sans additif) et des poudres synthétisées dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPD en présence de 1 mM Mg²⁺, 1 mM Zn²⁺, 1 mM Cu²⁺ ou 1 mM Fe³⁺ introduit dans la solution tampon (t) ou dans la seringue de solution de réactif (s).

II-6 Influence d'additifs ioniques sur la précipitation de la phase m-CPPT β en conditions contrôlées

II-6-1 Additif initialement présent dans la solution tampon : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX

La méthode de synthèse mise au point en réacteur agité a permis d'obtenir une poudre constituée de la phase m-CPPT β (par comparaison avec les données de référence de la fiche JCPDS n°01-070-4788) dans les conditions de pH (4,5) et température (25°C) choisies. Les diffractogrammes de RX de la phase prise comme référence dans cette étude (m-CPPT β synthétisé en l'absence d'additif) ainsi que le produit des synthèses réalisées dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPT β en présence d'ions Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} ou $S_2O_3^{2-}$ initialement ajoutés dans la solution tampon (t) sont présentés sur la Figure II-16. Si on examine les diffractogrammes de RX des échantillons synthétisés en présence d'un additif ionique, on remarque qu'ils sont constitués de m-CPPT β ou a-CPP ou d'un mélange de ces deux phases.

Les diagrammes DRX réalisés sur les poudres obtenues en présence d'additifs ioniques présentent les pics caractéristiques de la phase m-CPPT β , notamment le pic à $2\theta = 7,78^\circ \pm 0,02$ (pic de Bragg 110).

En suivant le même raisonnement que pour l'étude avec les phases t-CPPD et m-CPPD, nous montrons qu'aucune phase cristallisée de pyrophosphate de magnésium, de zinc, de cuivre ou de fer n'a précipité en quantité au-delà du seuil de détection par DRX (2%).

En examinant plus attentivement les diagrammes DRX, on distingue un léger halo diffus autour de $2\theta = 30^\circ$ dans le cas du Zn^{2+} (Figure II-16) qui devient bien distinct sur la Figure II-17 qui présente le diffractogramme RX de la poudre synthétisée en présence de 1 mM Zn^{2+} comparée à celui des poudres a-CPP et m-CPPT β de référence. Le halo diffus observé est caractéristique de la présence d'une certaine proportion de phase amorphe (a-CPP) dans l'échantillon.

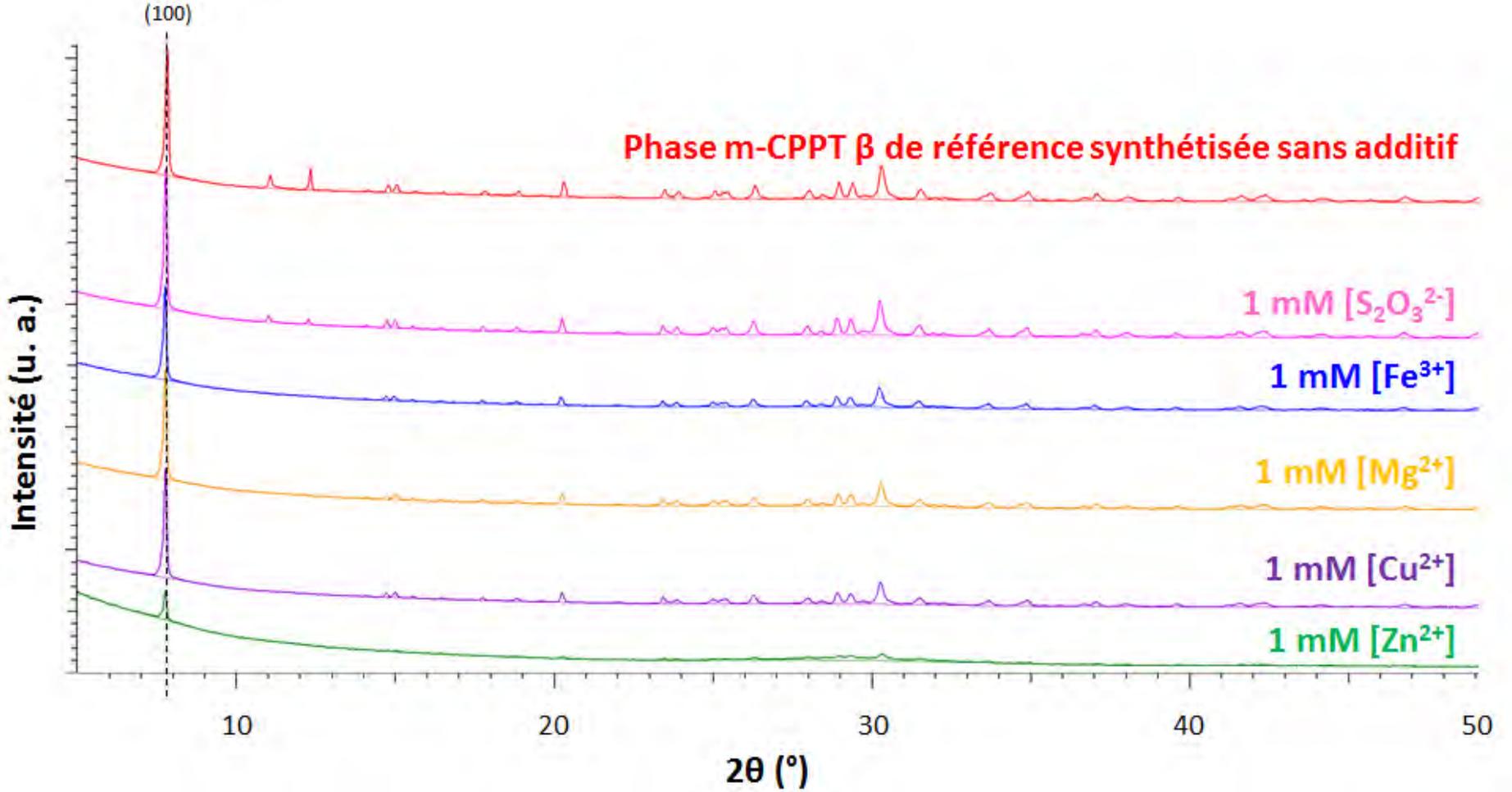


Figure II-16 - Diagrammes DRX de la phase pure m-CPPT β de référence (sans additif) et des poudres synthétisées en présence de chaque additif ionique (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , $S_2O_3^{2-}$) initialement présent dans la solution tampon (t) et conduisant à l'obtention d'une concentration en additif de 1 mM à la fin de la synthèse.

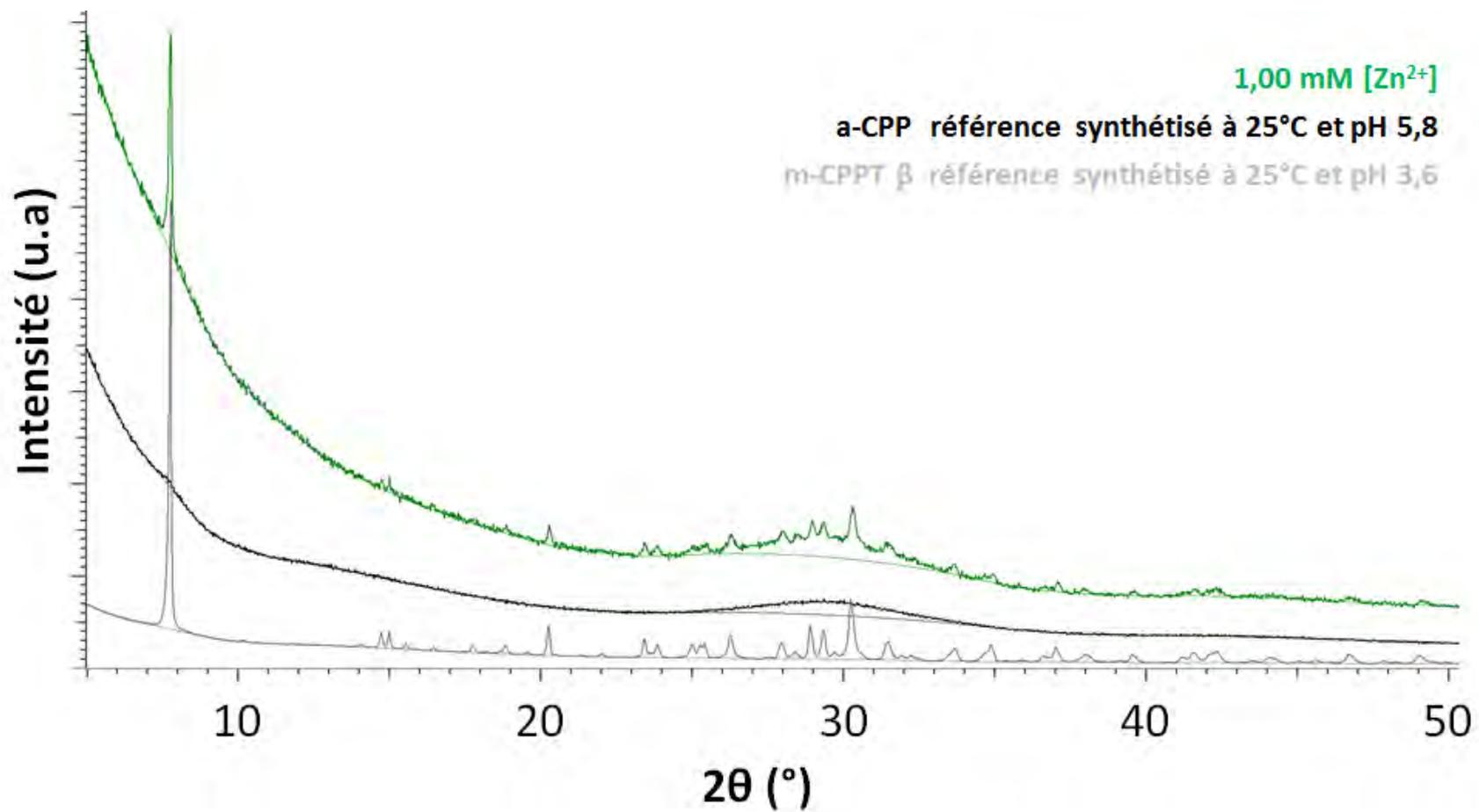


Figure II-17 - Diagrammes DRX de la phase α -CPP de référence, d'une phase m -CPPT β pure et de la poudre synthétisée en présence de 1 mM Zn^{2+} initialement présent dans la solution tampon (t) et conduisant à l'obtention d'une concentration en additif de 1 mM à la fin de la synthèse.

Suite à ces observations qualitatives nous avons réalisé une étude semi-quantitative à partir des résultats de DRX (cf. Annexe n°2) afin de déterminer les proportions relatives des phases m-CPPT β et a-CPP contenues dans les échantillons synthétisés (Tableau II-9). Il apparaît que l'échantillon de m-CPPT β de référence synthétisé sans additif est totalement cristallisé et parfaitement pur (100 % m/m de m-CPPT β). Une proportion élevée de phase amorphe (80% m/m) a été déterminée pour la poudre synthétisée en présence de Zn^{2+} en cohérence avec l'observation d'un halo diffus sur son diagramme DRX (Figure II-16). Par ailleurs, les échantillons synthétisés en présence de 1 mM Mg^{2+} , Cu^{2+} ou Fe^{3+} comportent eux aussi un peu d'a-CPP (respectivement 10, 10 et 12 % m/m). En revanche, la composition de l'échantillon synthétisé en présence de 1 mM $S_2O_3^{2-}$ initialement introduit dans la solution tampon ne diffère pas de celle de la phase m-CPPT β de référence (sans additif) (100 % m-CPPT β). Les ions Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} et $S_2O_3^{2-}$ n'ont pas d'influence sur la formation de m-CPPT β (protocole t). En conclusion, l'ion Zn^{2+} et les ions Mg^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{3+} inhibent respectivement fortement et peu la cristallisation de la phase m-CPPT β selon le protocole (t).

Tableau II-9 – Pourcentage massique relatif des phases m-CPPT β et a-CPP présentes dans les échantillons synthétisés en présence ou non d'un additif ionique initialement présent dans la solution tampon (t). Toutes les expériences ont été dupliquées.

Concentration finale en additif ionique	m-CPPT β (% m/m)	a-CPP (% m/m)
Sans additif (référence)	100 \pm 1	0 \pm 1
1,00 mM [$S_2O_3^{2-}$]	100 \pm 1	0 \pm 1
1,00 mM [Mg^{2+}]	90 \pm 1	10 \pm 1
1,00 mM [Fe^{3+}]	88 \pm 1	12 \pm 1
1,00 mM [Zn^{2+}]	20 \pm 1	80 \pm 1
1,00 mM [Cu^{2+}]	90 \pm 1	10 \pm 1

II-6-2 Additif initialement présent dans l'un des deux réactifs (seringue) : analyse qualitative et semi-quantitative par DRX

La Figure II-18 illustre les diagrammes DRX des poudres synthétisées dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPT β en présence de 1 mM d'additif ionique initialement présent dans la solution de réactif cationique ou anionique (s) selon qu'il s'agisse respectivement d'un anion ou d'un cation. Les résultats de l'étude semi-quantitative réalisée à partir des données de DRX présentées sur la Figure II-18 sont reportés dans le Tableau II-10.

Le pic à $2\theta = 7,78^\circ \pm 0,02$ (pic de Bragg 110) caractéristique de la phase m-CPPT β est présente sur les diffractogrammes RX de tous les échantillons synthétisés en présence

d'additifs exceptée pour le cas du Fe^{3+} qui ne présente aucun pic de diffraction. On note aussi la présence d'un halo diffus autour de $2\theta = 30^\circ$, caractéristique de la phase amorphe, sur les diagrammes DRX des échantillons synthétisés en présence de 1mM de Zn^{2+} , Cu^{2+} ou Fe^{3+} (Figure II-18). Les résultats présentés dans le Tableau II-10 confirment cette observation et démontrent l'effet inhibiteur déterminant des ions Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} et Mg^{2+} sur la cristallisation de la phase m-CPPT β : ces ions favorisent la formation de phase amorphe (respectivement 54 %, 76 %, 82 % et 100 % m/m d'a-CPP) au détriment de la phase m-CPPT β . L'ion Fe^{3+} en inhibant complètement la cristallisation du m-CPPT β possède l'effet le plus remarquable. A l'inverse, l'ion $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ n'a pas d'effet sur la cristallisation du m-CPPT β puisque la poudre synthétisée en sa présence est composée à 100 % m/m de phase m-CPPT β tout comme la poudre de référence (sans additif).

En outre, on peut conclure qu'il n'y a pas de phases cristallines de pyrophosphate de magnésium, zinc, cuivre ou fer ayant co-précipitées, puisque comme indiqué précédemment pour les échantillons précipités à l'aide du protocole (t), si ces phases avaient été présentes dans les échantillons elles auraient été détectables compte tenu de la limite de détection (2%) des analyses de DRX.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur déterminant de la cristallisation de la phase m-CPPT β par les ions Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et Fe^{3+} .

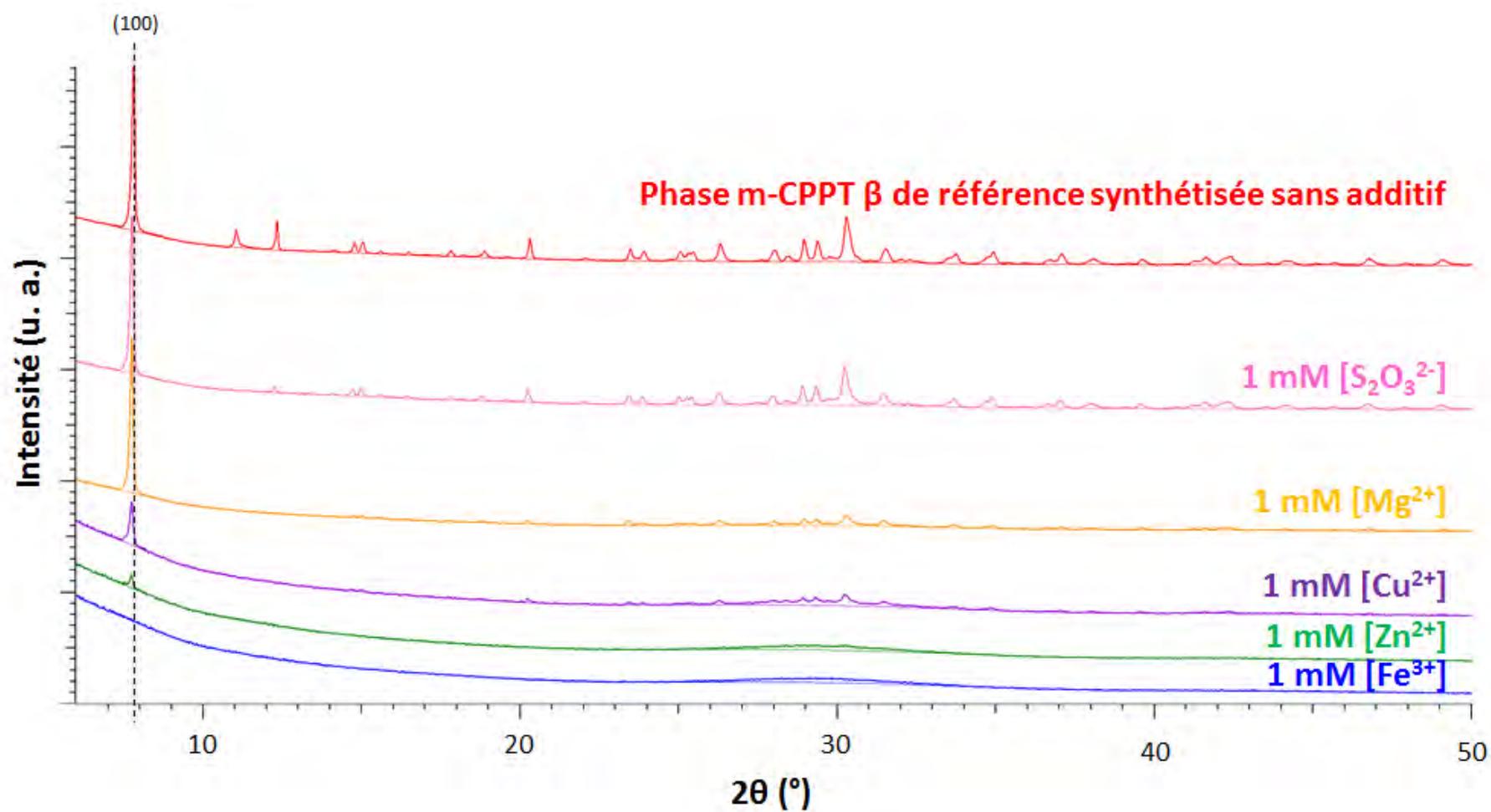


Figure II-18 - Diagrammes DRX de la phase m-CPPT β de référence (sans additif) et des poudres synthétisées en présence de chaque additif ionique (Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, S₂O₃²⁻) initialement présent dans la solution de réactif(s) et conduisant à l'obtention d'une concentration en additif de 1 mM à la fin de la synthèse.

Tableau II-10- Pourcentage massique relatif des phases m-CPPT β et a-CPP présentes dans les échantillons synthétisés en présence ou non d'un additif ionique initialement introduit dans une solution de réactif (s). Toutes les expériences ont été dupliquées.

Concentration finale en additif ionique dans le milieu de précipitation	m-CPPT β (% m/m)	a-CPP (% m/m)
Sans additif (référence)	100 \pm 1	0 \pm 1
1,00 mM [S ₂ O ₃ ²⁻]	100 \pm 1	0 \pm 1
1,00 mM [Mg ²⁺]	45 \pm 1	54 \pm 1
1,00 mM [Fe ³⁺]	0 \pm 1	100 \pm 1
1,00 mM [Zn ²⁺]	18 \pm 1	82 \pm 1
1,00 mM [Cu ²⁺]	24 \pm 1	76 \pm 1

II-6-3 Discussion sur l'influence du mode d'introduction des additifs

Comme précédemment détaillé dans les cas du t- et du m-CPPD (parties II-4 et II-5), nous avons testé les effets de chaque type d'additif ionique sur la précipitation du m-CPPT β en l'introduisant dans le milieu de précipitation suivant deux voies :

- Additif (A) initialement présent dans la solution tampon.
- Additif (A) initialement présent dans la seringue de la solution de réactif, ajoutée progressivement dans le milieu de précipitation. La concentration initiale en additif dans le réacteur est donc faible et les rapports A/Ca ou A/P restent constant.

Lorsque nous analysons les effets de chaque type d'additif ionique (pour une concentration finale de 1 mM et en considérant qu'il n'y a pas eu de co-précipitation), en considérant son mode d'introduction dans le milieu de précipitation (Tableau II-9 et Tableau II-10) et donc sa concentration dans la solution tampon, les résultats obtenus montrent que :

- a) l'ion S₂O₃²⁻ n'a pas d'effet quelle que soit la manière de l'introduire dans le milieu de précipitation ou la concentration utilisée,
- b) l'ion Mg²⁺ est un inhibiteur de la cristallisation du m-CPPT β puisqu'il conduit à la formation d'a-CPP (10% (t) et 54% (s)).
- c) l'ion Cu²⁺ est un inhibiteur de la cristallisation du m-CPPT β puisqu'il conduit à la formation d'a-CPP (10% (t) et 76% (s)).
- d) l'ion Zn²⁺ est un inhibiteur puissant de la cristallisation du m-CPPT β puisqu'il conduit à la formation d'une proportion importante d'a-CPP quel que soit son mode d'introduction dans le milieu de précipitation (80% (t) et 82% (s)).

e) l'ion Fe^{3+} est un inhibiteur de la cristallisation du m-CPPT β puisqu'il conduit à la formation d'a-CPP (10% (t) et 100% (s)). Son action inhibitrice est totale lorsqu'il est introduit dans la solution de réactif, ce qui fait de lui l'inhibiteur le plus puissant de la cristallisation du m-CPPT β (protocole (s)),

Pour l'ensemble des additifs cationiques testés, on remarque que leur action inhibitrice est plus marquée lorsque il est introduit dans la solution de réactif que lorsqu'il est initialement présent dans la solution tampon.

Au vu de ces résultats, les additifs ioniques testés peuvent être classés principalement en deux groupes en fonction de leur effet sur la précipitation de la phase m-CPPT β :

- 1) l'ion $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ sans d'effet sur la cristallisation du m-CPPT β ;
- 2) les ions Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} et Cu^{2+} , inhibiteurs plus ou moins puissants de la formation de la phase m-CPPT β selon leur mode d'introduction (protocole (s) ou (t)).

Ces expériences démontrent que la distribution de l'additif dans le réacteur (mode d'introduction) est comme dans le cas de l'étude de la précipitation du t- et du m-CPPD en présence d'additifs ioniques un paramètre crucial.

II-6-3-1 Analyses élémentaires complémentaires par ICP-OES

Des analyses élémentaires par ICP-OES ont été réalisées sur des échantillons de poudres synthétisées dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPT β afin d'obtenir des données complémentaires permettant d'élucider le rôle de l'additif ionique (A) dans le contrôle de la précipitation de la phase m-CPPT β . Les résultats de ces analyses (rapports molaires A/Ca, A/P, Ca/P, (Ca+A)/P et Ca/(P+A)) sont reportés dans le Tableau II-11.

Quel que soit le mode d'introduction de l'additif ionique (t ou s), les plus basses valeurs de rapports atomiques A/Ca et A/P sont obtenues pour les composés précipités en présence de l'ion $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (pour 1 mM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (s) : $5,47 \cdot 10^{-3}$ et $4,94 \cdot 10^{-3}$ et 1 mM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (t) : $5,51 \cdot 10^{-3}$ et $4,88 \cdot 10^{-3}$ respectivement). Ils varient entre 1,8% et 3,6% dans le cas des autres additifs (cationiques), indiquant un taux d'introduction de l'additif dans l'échantillon assez élevé, notamment 100% pour les cas de 1 mM de Mg^{2+} ou du Cu^{2+} introduit dans la solution tampon et du Zn^{2+} quel que soit son mode d'introduction. Comme précédemment, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas eu de précipitation de phases de pyrophosphate d'additif.

Il ressort que pour chaque additif les rapports A/Ca et A/P sont les plus élevés lorsque l'additif est introduit dans la solution tampon (t), ce qui correspond aux concentrations initiales en additifs les plus fortes (rapports A/Ca ou A/P initialement élevés dans la solution tampon, qui décroissent au cours de la précipitation) (Tableau II-11). Un rapport Ca/P inférieur à celui de l'échantillon de référence (sans additif) (0,90) est attendu si l'additif ionique s'est incorporé aux CPP précipités. C'est en effet ce qui est observé (Tableau II-11). De plus le rapport Ca/P est inférieur à 1 alors qu'il devrait être égal à 1 dans les cas de l'échantillon de référence, parfaitement pur d'après les analyses semi-quantitatives. Des analyses préliminaires réalisées par RMN du solide du ^{31}P sur ces poudres synthétisées en présence d'additifs cationiques dans la solution de réactifs de calcium (Annexe 4 ; Figure 4-4) nous ont permis de constater la présence d'une composante vraiment mineure à 11,3 ppm dans la poudre de référence (sans additif) et celle synthétisé en présence de Mg^{2+} . Cette composante est caractéristique d'une phase que nous n'avons pas su identifier pour le moment. De plus, elle n'est pas visible sur les spectres MAS des poudres synthétisées en présence de Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Fe^{3+} mais cela ne signifie pas qu'elle n'est pas présente, car la composante large de la forte quantité d'a-CPP présente dans ces échantillons s'étend au-delà de -12 ppm et la dissimulerait de toute façon. Nous pouvons alors supposer que cette phase, potentiellement présente dans toutes les poudres de cette étude et probablement en partie composée par du calcium et/ou du phosphore, présente un rapport Ca/P différent de 1. Cela expliquerait alors que le rapport Ca/P que nous avons déterminé et qui caractérise dans sa globalité la poudre de référence (sans additif) possède un rapport $\text{Ca/P} < 1$.

Tableau II-11- Rapports atomiques A/Ca, A/P, Ca/P, (Ca+A)/P et Ca/(P+A) calculés à partir des concentrations en Ca, P et d'additif (A) déterminées par analyse ICP-OES réalisées sur les poudres synthétisées en présence de l'additif ionique initialement introduit dans la solution de réactif (s) ou dans la solution tampon (t).

Concentration finale d'additif dans le milieu de précipitation	A/Ca	A/P	Ca/P	(Ca+A)/P	Ca/(P+A)
sans additif (référence)	-	-	0,90 ± 0,03	-	-
1,00 mM [S ₂ O ₃ ²⁻] (s)	(5,47 ± 0,11)·10 ⁻⁰³	(4,94 ± 0,11)·10 ⁻⁰³	0,90 ± 0,02	-	0,90 ± 0,02
1,00 mM [S ₂ O ₃ ²⁻] (t)	(5,51 ± 0,13)·10 ⁻⁰³	(4,88 ± 0,18)·10 ⁻⁰³	0,89 ± 0,02	-	0,88 ± 0,02
1,00 mM [Mg ²⁺] (s)	(2,10 ± 0,03)·10 ⁻⁰²	(1,84 ± 0,05)·10 ⁻⁰²	0,87 ± 0,03	0,89 ± 0,03	-
1,00 mM [Mg ²⁺] (t)	(3,13 ± 0,04)·10 ⁻⁰²	(2,70 ± 0,07)·10 ⁻⁰²	0,86 ± 0,02	0,89 ± 0,02	-
1,00 mM [Fe ³⁺] (s)	(3,18 ± 0,06)·10 ⁻⁰²	(2,46 ± 0,06)·10 ⁻⁰²	0,77 ± 0,01	0,80 ± 0,01	-
1,00 mM [Fe ³⁺] (t)	(3,25 ± 0,03)·10 ⁻⁰²	(2,82 ± 0,03)·10 ⁻⁰²	0,87 ± 0,01	0,90 ± 0,01	-
1,00 mM [Zn ²⁺] (s)	(3,11 ± 0,08)·10 ⁻⁰²	(2,71 ± 0,06)·10 ⁻⁰²	0,87 ± 0,02	0,90 ± 0,02	-
1,00 mM [Zn ²⁺] (t)	(3,59 ± 0,04)·10 ⁻⁰²	(3,02 ± 0,07)·10 ⁻⁰²	0,84 ± 0,02	0,87 ± 0,02	-
1,00 mM [Cu ²⁺] (s)	(2,69 ± 0,01)·10 ⁻⁰²	(2,40 ± 0,04)·10 ⁻⁰²	0,89 ± 0,02	0,92 ± 0,02	-
1,00 mM [Cu ²⁺] (t)	(3,64 ± 0,03)·10 ⁻⁰²	(3,10 ± 0,03)·10 ⁻⁰²	0,85 ± 0,02	0,88 ± 0,02	-

II-6-3-2 Analyses complémentaires en microscopie électronique à balayage

Les images MEB du m-CPPT β de référence et celles des poudres synthétisées dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPT β en présence d'ions Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Fe^{3+} initialement présents dans la solution tampon (t) ou la seringue de solution de réactif cationique (s) sont présentées sur la Figure II-19. Il s'agit des poudres synthétisées en présence d'additifs ayant présentés une influence sur la cristallisation du m-CPPT β lors cette étude. Quel que soit l'additif ionique impliqué excepté pour le cas du Fe^{3+} (s) qui sera discuté au paragraphe suivant, on note la présence de cristaux au faciès en plaquette sous forme de lamelles hexagonales caractéristiques de la phase m-CPPT β (Figure II-19 et Figure II-9). Sont aussi présents sur ces cristaux de m-CPPT β des particules relativement sphériques et petites caractéristiques de la phase a-CPP (Figure II-9). Ces particules recouvrent partiellement (Mg^{2+} (s et t), Cu^{2+} et Fe^{3+} (t)) ou presque entièrement (Zn^{2+} (s et t), Cu^{2+} et Fe^{3+} (s)) les agglomérats de m-CPPT β . Ces observations peuvent être reliées aux résultats de l'étude semi-quantitative faite à partir des analyses de DRX (Tableau II-9 et Tableau II-10) ; en effet, plus la proportion massique relative d'a-CPP dans l'échantillon est élevée (54 %, 76 %, et 82 % respectivement pour 1 mM Mg^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} (s)), plus la poudre en question présente des agglomérats de cristaux de m-CPPT β fortement recouverts d'a-CPP.

Le cas de l'échantillon synthétisés en présence de 1 mM Fe^{3+} (s) est considéré séparément étant donné que la phase a-CPP est majoritaire dans ce type d'échantillons (Tableau II-10). En accord avec les données de DRX, on constate sur la Figure II-18 que la morphologie en plaquette sous forme de lamelles hexagonales des cristaux de m-CPPT β (Figure II-19) n'est plus visible pour les échantillons synthétisés en présence de 1 mM Fe^{3+} (s ; 100 % d'a-CPP). La phase a-CPP (Figure II-19 ; 1 mM Fe^{3+} (s)) observée présente des particules constituées de plus petites particules (inférieures à 1 μm) rondes et agglomérées. Cette morphologie de phase amorphe de CPP correspond parfaitement à celle décrite par Gras *et al.* (Gras *et al.*, 2013a) (Figure II-9 ; a).

D'autres investigations structurales en utilisant la RMN du solide ont été réalisées pour faire la lumière sur le mécanisme d'action possible de certains de ces additifs ioniques.

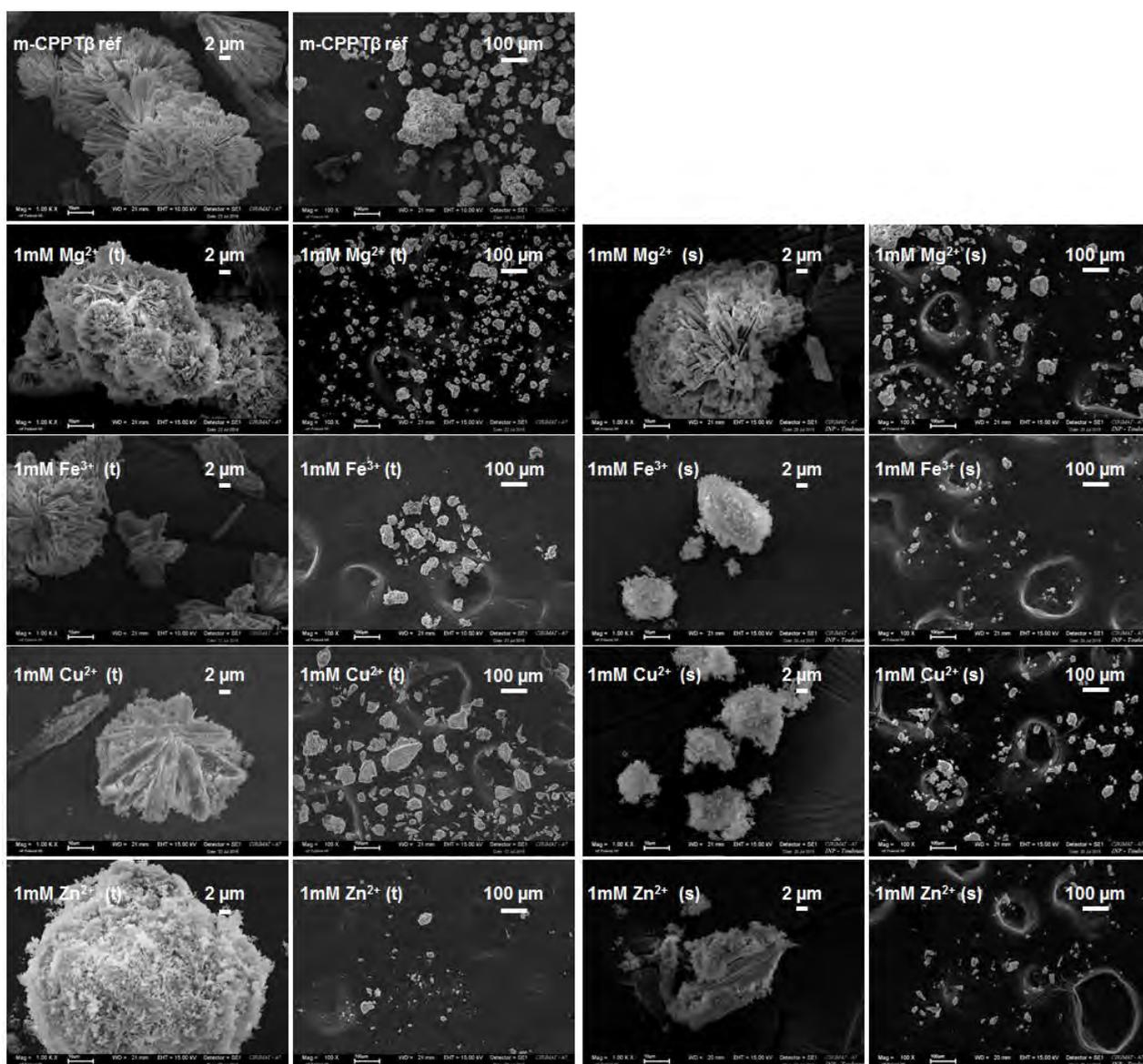


Figure II-19- Images MEB de la poudre de référence (*m*-CPPT β) et des poudres synthétisées dans les conditions d'obtention de la phase *m*-CPPT β en présence de 1 mM Mg^{2+} , 1 mM Zn^{2+} , 1 mM Cu^{2+} ou 1 mM Fe^{3+} introduits dans la solution tampon (t) ou dans la seringue de solution de réactif (s).

II-7 Analyses structurales par spectroscopie RMN du solide

Une étude structurale complémentaire par RMN du solide du ^{31}P a été réalisée sur les échantillons synthétisés afin d'approfondir l'interprétation du rôle des additifs ioniques dans la précipitation des phases de CPPD d'intérêt biologique. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Christian Bonhomme et Cristina Coelho-Diogo du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée – UMR 7574 à Paris qui sont également partenaires du projet ANR Blanc CAPYROSIS (2013-2017).

Comme expliqué précédemment, aucune des méthodes de caractérisation utilisées jusqu'à présent n'a permis une identification structurale claire des dopants dans l'une ou l'autre des phases minérales identifiées, principalement en raison de la faible quantité d'additifs associés au solide précipité. La détermination des temps de relaxation longitudinale $T_1(^{31}\text{P})$ pourrait donner une réponse à la question portant sur l'incorporation (ou non) de l'additif cationique dans le réseau cristallin de l'une des phases m- et/ou t-CPPD. D'une manière générale, les T_1 observés en RMN du solide sont fortement dépendants de la présence d'espèces paramagnétiques, qui sont connues pour réduire considérablement leurs valeurs (Sherriff and Hartman, 1985), (Hayashi *et al.*, 1992). Ainsi, cette méthode est particulièrement utile pour l'étude de l'influence d'ions paramagnétiques comme Cu^{2+} et Fe^{3+} , alors qu'avec des espèces diamagnétiques telles que Zn^{2+} et Mg^{2+} les effets attendus sont très fortement minimisés (ces cations sont introduits en très petites quantités, et l'abondance naturelle du ^{25}Mg (10%) et ^{67}Zn (4,102%), qui sont des noyaux quadripolaires, est inférieure ou égale à 10%).

Enfin, l'utilisation d'ions $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ comme additif n'ayant pas montré d'effet notable sur la formation de t-CPPD ou m-CPPD, nous n'avons pas été plus loin dans les investigations structurales sur l'effet de cet additif anionique.

Dans les paragraphes qui suivent les phases de CPP qualifiées « de référence (100% pure) » sont des phases pures synthétisées dans les conditions exactes du protocole mis au point par Gras *et al.* (Gras *et al.*, 2013a). Les phases de CPP qualifiées « de référence (sans additif) » sont les phases de CPP synthétisées sans additif dans le réacteur agité et dans les conditions définies dans le présent travail de thèse.

II-7-1 Cas des poudres synthétisées en présence d'additifs dans les conditions d'obtention de la phase t-CPPD.

Le spectre du ^{31}P à l'angle magique (Magic Angle Spinning : MAS) de la phase de t-CPPD prise comme référence (sans additif) dans ce travail est présenté sur la Figure II-20. Comme observé précédemment par Gras *et al.* (Gras et al., 2016a), la phase t-CPPD (notée t sur la Figure II-20) est caractérisée par deux pics fins situés à -5,14 et -6,24 ppm. L'observation de deux résonances du ^{31}P est en accord avec les données cristallographiques reportées dans la littérature (Gras et al., 2016a). Une étude plus détaillée de ce spectre permet d'observer la présence de deux composantes vraiment mineures à -7,5 et -9,96 ppm. Elles correspondent respectivement à la phase a-CPP de référence 100% pure (notée a sur la Figure II-20) et m-CPPD de référence 100% pure (notée m sur la Figure II-20). A noter que la phase m-CPPD est également caractérisée par une seconde résonance à -6,30 ppm, qui dans le cas présent est superposée à l'un des pics de la phase t-CPPD. Ces phases secondaires ont été considérées ici comme négligeables. Le temps de relaxation $T_1(^{31}\text{P})$ mesuré par saturation-retour est égal à 76,3 s pour le t-CPPD (Tableau II-12).

La phase m-CPPD est caractérisée par deux pics de résonance centrés sur -5,91 et -9,68 ppm (Figure II-20) ; ces déplacements chimiques sont sensiblement différents de ceux obtenus pour la phase pure de Gras *et al.* (Gras et al., 2016a). Le temps de relaxation $T_1(^{31}\text{P})$ mesuré est égal à 96,0 s pour le m-CPPD (Tableau II-12). Dans le cas de l'a-CPP, une composante élargie est observée : le maximum de la raie de résonance est centré à ~ -5 ppm (Figure II-20) et celle-ci présente un temps de relaxation $T_1(^{31}\text{P})$ égal à 29,5 s (Tableau II-12).

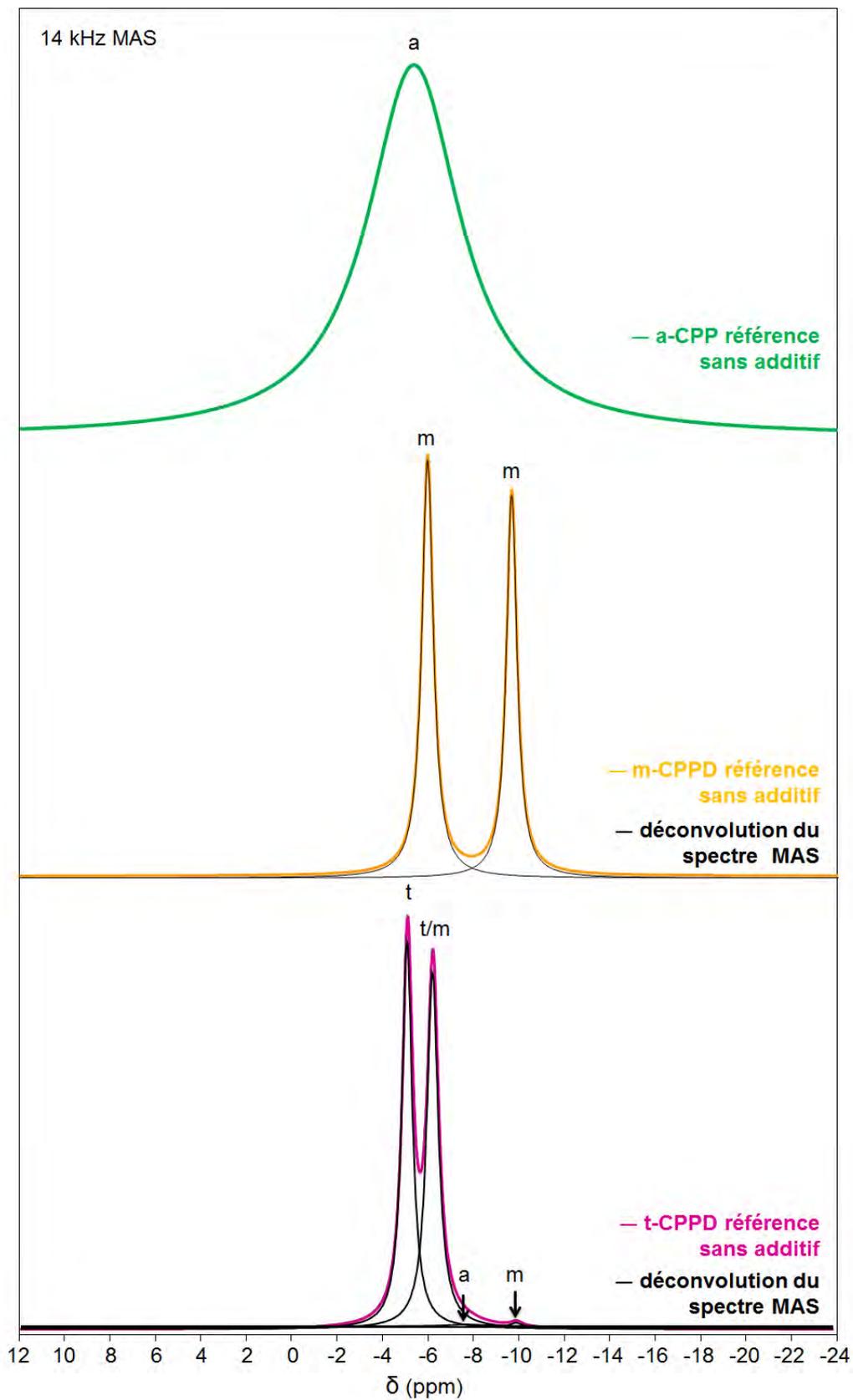


Figure II-20- Spectres RMN ^{31}P MAS (découplé de ^1H lors de l'acquisition) du composé de référence (synthétisés sans additifs) *t*-CPPD et des composés de référence 100% pure *m*-CPPD et *a*-CPP. Les différentes composantes des spectres MAS sont repérées par les notations suivantes : *t* (*t*-CPPD), *m* (*m*-CPPD, et *a* (*a*-CPP).

Tableau II-12- Temps de relaxation $T_1(^{31}\text{P})$ mesurés par saturation-retour pour chaque pic identifié sur les spectres RMN ^{31}P MAS des phases de référence 100% pure d'a-CPP et m-CPPD, et des échantillons synthétisés dans les conditions d'obtention de la phase t-CPPD sans additif (t-CPPD référence) et en présence (ou absence) d'ions Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} ou Mg^{2+} introduits dans la solution de réactif de calcium (s) ou dans la solution tampon (t). Les déplacements chimiques isotropes, les largeurs de pics et les proportions molaires relatives sont également donnés. Notations utilisées : t : t-CPPD, m : m-CPPD, a : a-CPP, sPP : pyrophosphate de calcium décalé.

Phases de référence		$\delta (^{31}\text{P})$ (ppm)			
		Largeur de pic (ppm)			
		Temps de relaxation $T_1 (^{31}\text{P})$ (s)			
m-CPPD (100% pur) (Figure II-20)	de	-5,91 0,68	-9,68 0,63		
		96,0 (\pm 0,4)			
t-CPPD (sans additif) (Figure II-20)	de	-5,14 0,55	-6,24 0,61		
		76,3 (\pm 5,8)			
a-CPP (100% pur) (Figure II-20)	de	\sim -5 1,1			
		29,5 (\pm 2,7)			
Echantillons précipités en présence d'additifs ioniques		Déplacement chimique $\delta (^{31}\text{P})$ (ppm)			
		Largeur de pic (ppm)			
		Temps de relaxation $T_1 (^{31}\text{P})$ (s)			
		Aire (pourcentage relatif) (%)			
Composantes	t	t/m	m	sPP	a
1 mM [Cu^{2+}] (s)	- 5,41	-	-	\sim -2,0	-7,6 / -9,2
	0,58	0,52	0,59	3,0	1,1 / 1,8
	-	2,0	2,0 \pm	-	\sim 4
	4	46	37	2	6 / 5
1 mM [Cu^{2+}] (t)	- 5,40	-	-	\sim -1,5	-7,9 / -9,2
	0,89	0,59	0,53	6,4	1,4 / 2,2
	-	2,6	2,6 \pm	-	\sim 4
	6	33	26	15	13 / 7
1 mM [Fe^{3+}] (s)	-	-	-9,9	\sim 1	\sim -7,5
	-	-	1,6	\sim 4	\sim 6
	-	-	3,3 \pm	-	< 1
	-	-	7	12	81
1 mM [Fe^{3+}] (t)	-	-	-9,98	\sim 1	-7,8
	-	0,70	0,73	\sim 3	\sim 6
	-	< 1	< 1	-	< 1
	-	22	22	3	53
1 mM [Zn^{2+}] (s)	- 5,52	-	-	-	-7,3 / -9,2
	0,58	0,67	0,66	-	2,49 / 1,76
	-	43,4	49,7 \pm	-	\sim 12
	3	35	32	-	18 / 12
1 mM [Zn^{2+}] (t)	- 5,47	-	-	-	-7,2 / -9,1
	0,50	0,70	0,66	-	1,4 / 1,8
	-	74,0	93,7 \pm	-	-
	3	42	35	-	9 / 11
Composantes	t	t	m	m	a
1 mM [Mg^{2+}] (s)	-5,57	-	-7,7	-	-6,03
	0,59	0,70	1,66	0,84	0,89
	25,8 \pm	27,7	-	-	-
	43	49	5	3	-
1 mM [Mg^{2+}] (t)	- 5,56	-	-9,28	-	-7,97
	0,59	0,74	1,44	0,64	1,72
	104,4 \pm	65,2	35,3 \pm	65,8 \pm	-
	29	53	2	16	-

II-7-1-1 Cas des échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+}

Les spectres RMN ^{31}P MAS des échantillons obtenus en présence de 1,00 mM de Cu^{2+} initialement présents soit dans le tampon (t) soit dans la solution de réactifs (s) sont présentés sur la Figure II-21. Lorsque l'on compare ces spectres avec ceux de références du t-CPPD (sans additifs) et m-CPPD et a-CPP (100% pures), il apparaît que les spectres des échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+} sont principalement composés de phase m-CPPD, ce qui confirme les données de DRX (Tableau II-3 et Tableau II-4). Les déplacements chimiques isotropes de noyau ^{31}P sont centrés sur -6,44 et -10,24 ppm, légèrement décalés par rapport à ceux de la référence m-CPPD (100% pure) (Tableau II-12). Cette variation peut être attribuée à la présence de cations Cu^{2+} dans l'échantillon, qui a été confirmée par l'analyse élémentaire par ICP-OES : les rapports molaires $\text{Cu}/\text{Ca}(\text{s})$ et $\text{Cu}/\text{P}(\text{s})$ sont tous deux environ égaux à 2% ; $\text{Cu}/\text{Ca}(\text{t})$ et $\text{Cu}/\text{P}(\text{t})$ sont tous deux égaux à environ 3% (Tableau II-5). Une déconvolution des spectres est également présentée sur la Figure II-21. La phase t-CPPD y est présente en tant que composante mineure du spectre, ainsi qu'une composante beaucoup plus large qui pourrait être attribuée à une phase amorphe. Cette composante amorphe est plutôt asymétrique contrairement à celle observée pour la phase a-CPP de référence pure à 100% et sa déconvolution nécessite l'utilisation de deux composantes pour être correcte (par conséquent, ces deux composantes ont été utilisées dans la déconvolution finale et elles sont toutes deux indiquées par la notation "a" sur la Figure II-21). La forme de cette résonance particulière n'a pas été analysée davantage, mais utilisée comme modèle pour la déconvolution spectrale et les analyses quantitatives (Tableau II-12). Les données obtenues sont en accord avec les résultats d'analyse semi-quantitative par DRX (Tableau II-3 et Tableau II-4). Même si les données d'analyse semi-quantitative de DRX fournissent des résultats en pourcentages massiques et celles de RMN en pourcentages molaires des phases de CPP, il est possible de globalement les comparer car les CPP impliqués dans tous les échantillons ont des poids moléculaires comparables (2 molécules d'eau pour le t-CPPD et le m-CPPD et entre 3 et 4 molécules d'eau sont associées à la phase d'a-CPP) (Gras *et al.*, 2013b).

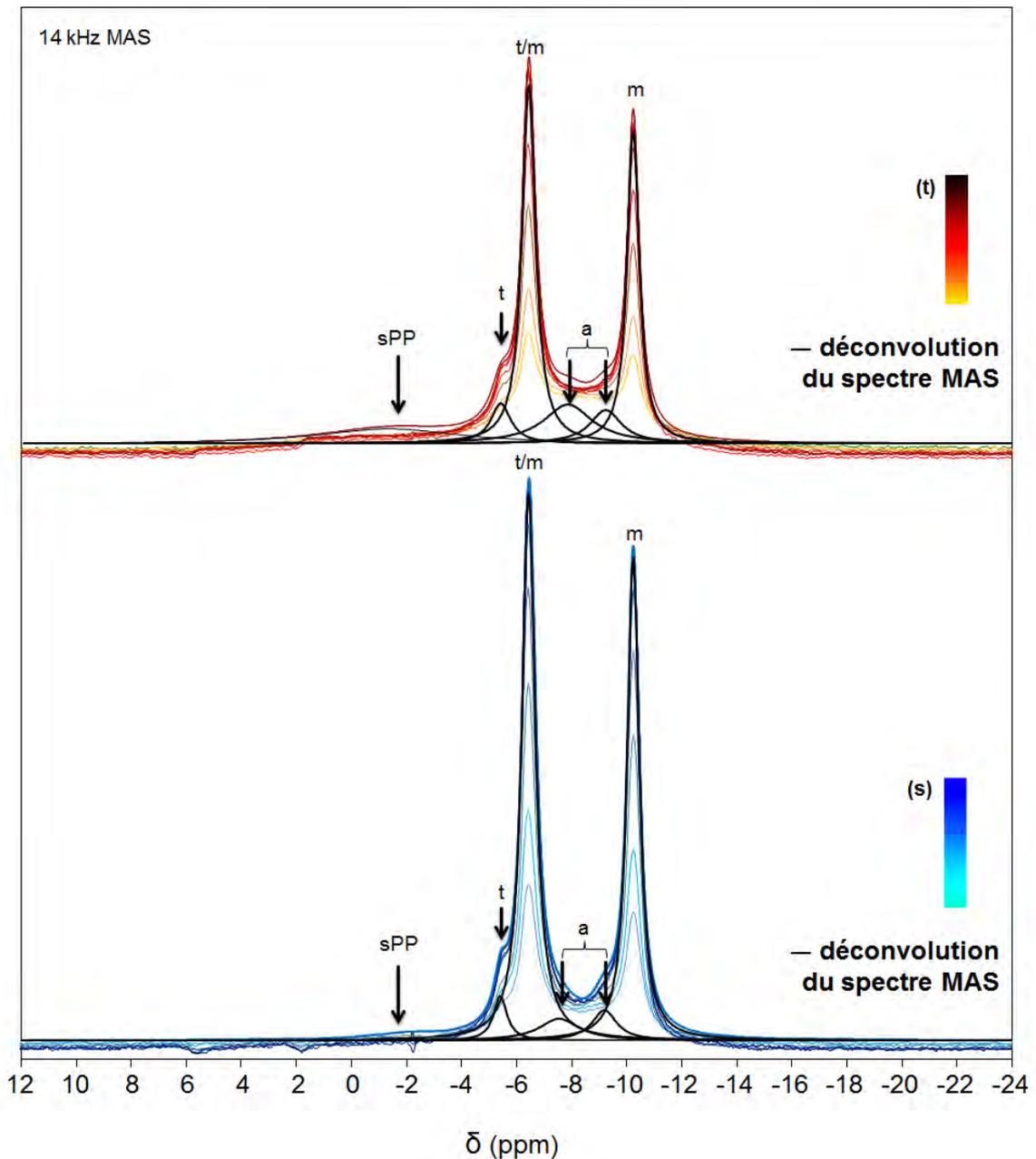


Figure II-21- Spectres RMN ^{31}P MAS (découplé de ^1H lors de l'acquisition) des échantillons synthétisés en présence de 1,00 mM de Cu^{2+} introduit dans la solution tampon (t) ou dans la solution de réactif de calcium (s). Le délai de relaxation incrémenté après la séquence d'impulsions de saturation (1, 5, 10, 20, 30, 60, 120 et 180s) correspond aux spectres du bas vers ceux du haut (retour de l'aimantation ^{31}P). Les différentes composantes des spectres MAS sont repérées par les notations suivantes : t (t-CPPD), m (m-CPPD), a (a CPP) et sPP (pyrophosphate de calcium décalé).

Enfin, on note la présence d'une composante large centrée sur $\sim -2,0$ ppm. L'intensité de cette composante particulière est faible mais mesurable. Son élargissement est plus prononcé dans le cas du protocole (t) que dans le cas du protocole (s). Nous rappelons ici que la poudre synthétisée selon le protocole (t) contient une plus grande quantité d'ions Cu^{2+} que dans le cas du protocole (s) ($\text{Cu/P(s)} < \text{Cu/P(t)}$; Tableau II-5) A ce stade, deux attributions distinctes peuvent être proposées pour cette composante élargie : (i) des orthophosphates, tels que ceux qui peuvent être obtenus en tant que produits de l'hydrolyse partielle du pyrophosphate de calcium (Gras *et al.*, 2016a) ou (ii) des pyrophosphates présentant des déplacements chimiques isotropes $\delta_{\text{iso}}(^{31}\text{P})$ décalés (déblindés) en raison de l'effet paramagnétique des cations Cu^{2+} . Du point de vue de la RMN, des expériences ^{31}P INADEQUATE devraient permettre de définir précisément l'attribution de cette composante (Slater *et al.*, 2011), étant donné que cette expérience à double quanta (DQ) n'est sensible qu'aux seuls groupes pyrophosphates. Nous n'avons pas essayé de mettre en œuvre cette séquence, car l'intensité de la résonance impliquée était faible. Cependant, une telle composante large n'a pas été observée du tout dans le cas des cations diamagnétiques, à savoir Zn^{2+} et Mg^{2+} (respectivement, Figure II-23 et Figure II-24). En résumé, nous suggérons que la composante large centrée sur $\sim -2,0$ ppm peut être attribuée à des groupes pyrophosphates, relativement proche des centres paramagnétiques, Cu^{2+} (Sherriff and Hartman, 1985).

Compte tenu des valeurs de $T_1(^{31}\text{P})$ mesurées (Tableau II-12), nous nous sommes concentrés ici uniquement sur la phase principale m-CPPD, et avons constaté que $T_1(^{31}\text{P}) \cong 2,3$ s en moyenne pour les deux échantillons (protocoles (s) et (t)). En comparaison avec la phase m-CPPD de référence ($T_1(^{31}\text{P}) = 96,0$ s), une réduction drastique du temps de relaxation longitudinale des noyaux ^{31}P est observée. Cela peut être attribué à la présence de cations paramagnétiques Cu^{2+} dans la structure du m-CPPD. En effet, il est bien établi que la présence d'ions paramagnétiques est généralement un moyen très efficace pour améliorer la relaxation nucléaire (Abragam, 1961) (Sherriff and Hartman, 1985), (Grimmer *et al.*, 1983), (Oldfield *et al.*, 1983), (Hayashi *et al.*, 1992). Deux mécanismes de relaxation peuvent être considérés, à savoir un couplage dipolaire dans l'espace entre les électrons de l'ion paramagnétique et les noyaux qui relaxent et une interaction électronique par liaison (contact de Fermi). Les deux mécanismes sont généralement présents. L'effet du paramagnétisme sur les résonances de RMN peut être résumé de la manière suivante : (i) une perte de signal est observée pour les noyaux situés à proximité des centres paramagnétiques, (ii) les largeurs de pics peuvent augmenter de manière significative, (iii) les valeurs des temps de relaxation longitudinale T_1

(nucléaire) sont généralement fortement diminuées, (iv) des pics déplacés par l'interaction avec les ions paramagnétiques peuvent être observés sur le spectre RMN (McCarty and Stebbins, 2016).

Bien que présent en tant que composante mineure, $T_1(^{31}\text{P}) \cong 4 \text{ s}$ a été estimé pour la composante a-CPP. Aucune tentative n'a été faite pour extraire les données de $T_1(^{31}\text{P})$ pour les phases de t-CPPD (t) et de pyrophosphate décalé (sPP) étant donné que les intensités leur correspondant étaient intrinsèquement faibles.

II-7-1-2 Cas des échantillons synthétisés en présence de Fe^{3+}

Les spectres de RMN ^{31}P MAS des échantillons obtenus en présence de 1 mM en Fe^{3+} initialement présents dans le tampon (t) ou dans la solution de réactifs (s) sont présentés sur la Figure II-22. Toutes les données de déplacements chimiques isotropes et de $T_1(^{31}\text{P})$ sont reportées dans le Tableau II-12. Dans le cas du protocole (t), des similitudes avec les résultats des échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+} sont observées. En effet, les phases m-CPPD et a-CPP sont clairement les phases majoritaires de l'échantillon, mais avec un rapport molaire différent par rapport au cas de l'ion Cu^{2+} . Ce résultat est en bon accord avec les données semi-quantitatives obtenues par DRX (Tableau II-3 et Tableau II-4).

Dans le cas du protocole (s), un pic large présentant deux composantes a été obtenu : des pyrophosphates décalés (sPP) et une composante amorphe (a) (Figure II-22). Bien que la spectroscopie FTIR permette de distinguer les groupements orthophosphates des groupements pyrophosphates (Figure II-8), l'élargissement et le chevauchement des bandes de vibration excluent la possibilité de pouvoir leur donner une attribution précise. Une très faible quantité ($\sim 4\%$) d'une phase annexe ($\sim -9,9 \text{ ppm}$) a été détectée. Ce déplacement chimique isotrope du ^{31}P est en accord avec la présence de m-CPPD comme phase minoritaire, comme le montre également l'analyse par DRX (Tableau II-4).

En d'autres termes, l'ion Fe^{3+} est capable d'inhiber presque entièrement la cristallisation des phases de CPPD (m et t) en utilisant le protocole (s). Comme précédemment observé dans le cas des échantillons synthétisés en présence d'ions Cu^{2+} , une diminution drastique de $T_1(^{31}\text{P})$ a été observée pour les deux phases m-CPPD et a-CPP (respectivement 3,3 s et $< 1,0 \text{ s}$, à comparer à 96,0 s et 29,5 s, respectivement). Ces résultats confortent l'hypothèse que les cations Fe^{3+} sont insérés dans la maille du m-CPPD et dans la phase a-CPP.

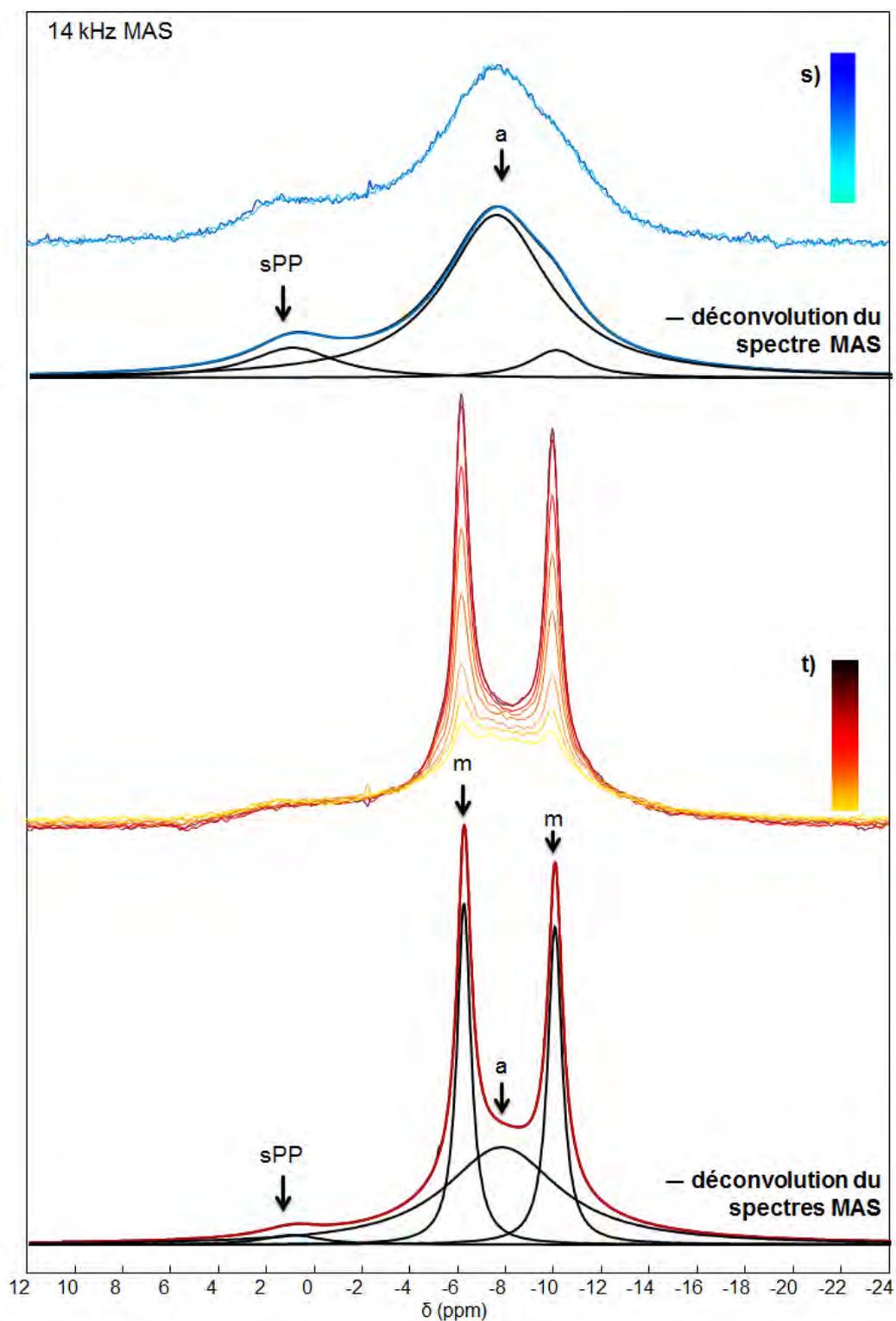


Figure II-22- Spectres RMN ^{31}P MAS (découplés de ^1H lors de l'acquisition) des échantillons synthétisés en présence de 1,00 mM de Fe^{3+} introduits dans la solution tampon (t) ou dans la solution de réactif de calcium (s). Le délai de relaxation incrémenté après la séquence d'impulsions de saturation (1, 5, 10, 20, 30, 60, 120 et 180s) correspond aux spectres du bas vers ceux du haut (retour de l'aimantation ^{31}P). Les différentes composantes des spectres MAS sont repérées par les notations suivantes : m (m-CPPD), a (a-CPP) et sPP (pyrophosphate de calcium décalé).

Dans le cas de Fe^{3+} (protocole (t)), on observe en outre que la raie de résonance associée à l'a-CPP est beaucoup plus large que dans le cas de Cu^{2+} (Figure II-22). Cette observation est en parfait accord avec les données semi-quantitatives de DRX mentionnées auparavant (62 % m/m de phase a-CPP dans le cas du Fe^{3+} et 36% m/m dans le cas du Cu^{2+} ; Tableau II-3).

II-7-1-3 Cas des échantillons synthétisés en présence de Zn^{2+} ou Mg^{2+}

Les spectres RMN ^{31}P MAS des échantillons obtenus en présence de 1,00 mM de Zn^{2+} et Mg^{2+} (espèces diamagnétiques) initialement présents dans la solution tampon (t) ou dans la solution de réactif de calcium (s) sont respectivement présentés sur les Figure II-23 et Figure II-24. Toutes les données de déplacements chimiques isotropes et $T_1(^{31}\text{P})$ sont reportées dans le Tableau II-12. Dans le cas de Zn^{2+} (Figure II-23), des similitudes avec les résultats des échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+} sont observées. En effet, la phase m-CPPD est clairement la phase principale entrant dans la composition de l'échantillon, mais avec une proportion relative différente par rapport au cas de Cu^{2+} . Ce résultat est en accord avec les données de DRX (Tableau II-3 et Tableau II-4). En outre, les proportions molaires des différentes phases indiquées dans le Tableau II-12 sont également en adéquation avec les données de DRX (Tableau II-3 et Tableau II-4) et confirment que les phases m-CPPD et a-CPP sont en effet obtenues comme phases majoritaires.

Dans le cas du protocole (s) appliqué à l'additif Zn^{2+} , la contribution de la composante amorphe est caractérisée par deux composantes comme observé sur la Figure II-23. En outre, une contribution faible attribuée à la phase t-CPPD est bien mise en évidence. Enfin, une résonance est observée à ~ 0 ppm : cette dernière peut être considérée comme négligeable.

Comme cela a déjà été observé dans le cas des échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+} , on note une réduction significative du $T_1(^{31}\text{P})$ pour les phases m-CPPD ($\sim 45,0$ s) et a-CPP ($\sim 12,0$ s) (rappelons que $T_1(^{31}\text{P}) = 96,0$ et $29,5$ s respectivement pour les phases de référence m-CPPD et a-CPP 100% pure). Cependant, cette réduction du temps de relaxation longitudinale n'est pas aussi prononcée que dans le cas des ions paramagnétiques, Cu^{2+} et Fe^{3+} . Dans ce cas, tout effet de relaxation paramagnétique est exclu. Cela peut alors s'expliquer par l'incorporation des cations Zn^{2+} dans la structure de la phase m-CPPD ainsi que dans l'a-CPP, conduisant à la création de défauts locaux et par conséquent à la diminution des valeurs de $T_1(^{31}\text{P})$.

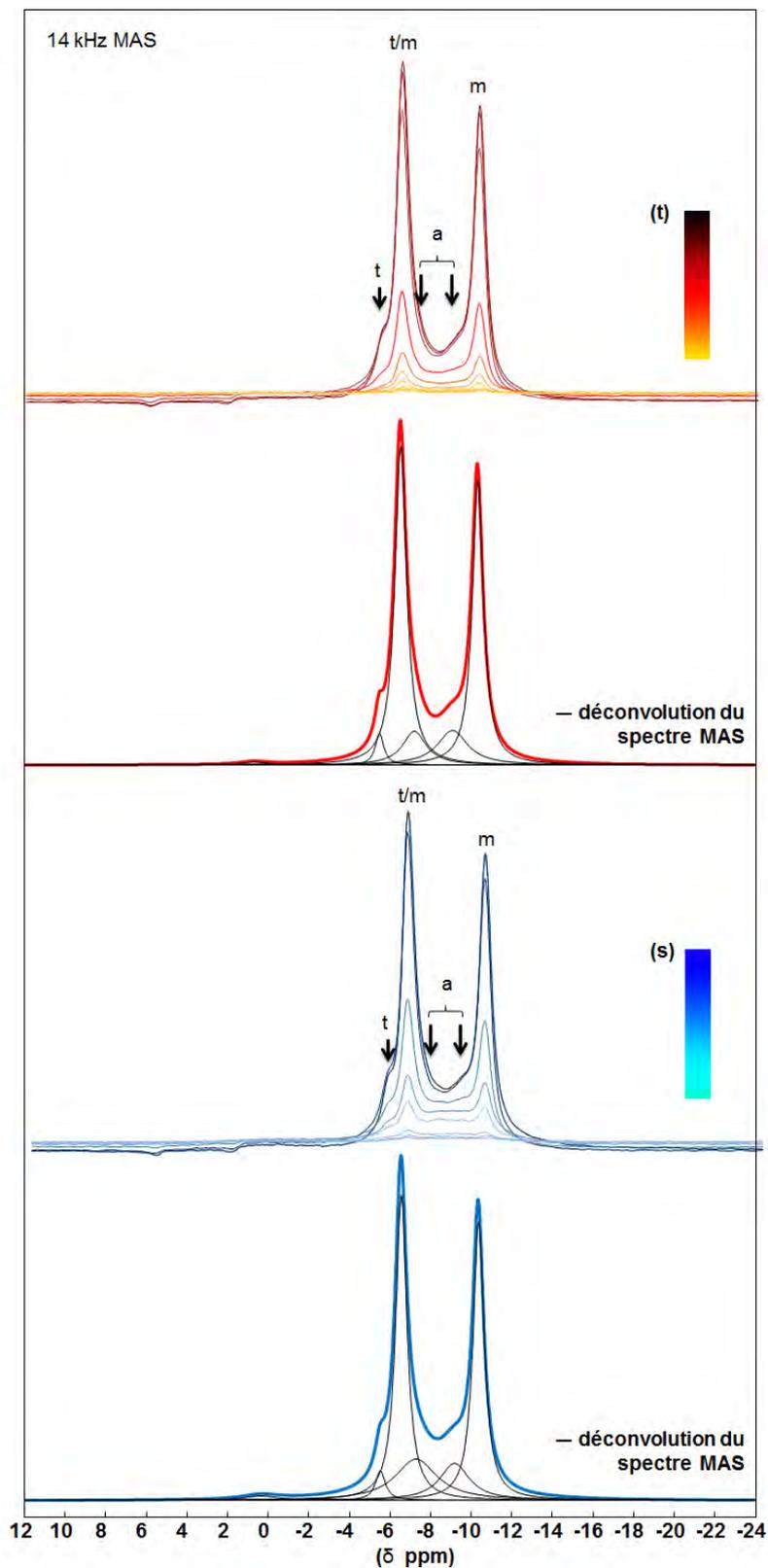


Figure II-23- Spectres RMN ^{31}P MAS (découplé ^1H lors de l'acquisition) des échantillons synthétisés en présence de $1,00\text{ mM}$ de Zn^{2+} introduit dans la solution tampon (t) ou dans la solution de réactif de calcium (s). Le délai de relaxation incrémenté après la séquence d'impulsions de saturation (1, 5, 10, 20, 30, 60, 120 et 180s) correspond aux spectres du bas vers ceux du haut (retour de l'aimantation ^{31}P). Les différentes composantes des spectres MAS sont repérées par les notations suivantes : t (t-CPPD), m (m-CPPD), a (a CPP).

Lorsque l'on compare les spectres obtenus dans le cas des ions Mg^{2+} (Figure II-24) avec ceux des phases de référence de t-CPPD (sans additifs) et m-CPPD et a-CPP 100% pure (Figure II-20), il apparaît que les échantillons synthétisés en présence d'ions Mg^{2+} sont majoritairement composés de la phase t-CPPD et comportent une phase minoritaire de m-CPPD dans le cas du protocole (t). Ce résultat est en parfaite adéquation avec les données de diffraction des rayons X (Tableau II-3 et Tableau II-4), et les proportions molaires des différentes phases indiquées dans le Tableau II-12 sont aussi en accord avec les données semi-quantitatives de DRX. Les déplacements chimiques isotropes du ^{31}P sont centrés sur $-5,70$, $-6,50$ et $-10,34$ ppm et légèrement déplacés par rapport à ceux des phases de référence. Ce décalage peut être attribué à la présence dans l'échantillon des cations Mg^{2+} qui a été confirmée par les analyses élémentaires ICP-OES : Mg/P (s) = $(7,0 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$; Cu/P (t) = $(9,1 \pm 1,9) \cdot 10^{-3}$ (Tableau II-5). Comme précédemment observé dans le cas des échantillons contenant des ions Zn^{2+} , une réduction du $T_1(^{31}P)$ de la phase t-CPPD de l'échantillon synthétisé en présence de Mg^{2+} ($T_1(^{31}P)_{t-CPPD} = 27,7$ s) à comparer à la valeur de $76,3$ s pour la phase t-CPPD) a été observée dans le cas du protocole (s) ainsi qu'une réduction du $T_1(^{31}P)$ de la phase m-CPPD dans le cas du protocole (t) ($T_1(^{31}P)_{m-CPPD} = 65,8$ s à comparer à la valeur de $96,0$ s pour la phase m-CPPD). Récemment, Gras *et al.* (Gras *et al.*, 2016b) ont rapporté certaines similitudes entre les structures des phases m-CPPD et t-CPPD avec celles d'autres phases de pyrophosphates dihydratés impliquant des cations métalliques divalents tels que Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} ou Co^{2+} , ce qui conforte les résultats suggérant l'introduction de l'ion Mg^{2+} dans la structure des phases de CPPD.

Ces expériences, utilisant les mêmes additifs ioniques introduits dans la solution tampon ou dans la solution de réactif, démontrent que la concentration initiale de l'additif et sa distribution dans le réacteur, combiné au niveau de sursaturation (Annexe 4 ; Figure 4-2), sont des paramètres cruciaux.

En ce qui concerne l'inhibition de la cristallisation du t-CPPD par les ions Fe^{3+} , il peut y avoir une compétition entre la précipitation du pyrophosphate de fer et du pyrophosphate de calcium, ou bien les ions Fe^{3+} peuvent être adsorbés à la surface des petits cristallites et bloquer une partie des sites de croissance (le rapport atomique Fe/Ca varie entre 2,7% et 4,9%, Tableau II-5). Si la première hypothèse était vraie, il devrait y avoir un décalage en abscisse des pics de Bragg sur le diffractogramme RX de l'échantillon contenant du Fe^{3+} dû à la présence de pyrophosphate de fer. Or il n'y a aucun décalage de ce type observé sur le diffractogramme RX en question attestant qu'aucune phase cristallisée de pyrophosphate de

fer ne se s'est formée. Cependant une phase amorphe de pyrophosphate de fer ne serait pas détectable par cette technique mais les analyses par spectroscopies FTIR et RAMAN ont montré que la phase amorphe présente dans les échantillons précipités en présence de Fe^{3+} est bien une phase amorphe de type a-CPP. D'autre part, il ne peut pas uniquement s'agir d'une adsorption de Fe^{3+} à la surface des CPP bien qu'il puisse y en avoir. En effet, les cristaux de CPP sont trop gros (rapport surface sur volume faible) pour que les ions paramagnétiques qui sont présents en surface puissent influencer significativement le temps de relaxation longitudinale de ^{31}P . Ces observations indiquent donc que l'ion Fe^{3+} s'est introduit dans la structure des phases d'a-CPP et m-CPPD présentes

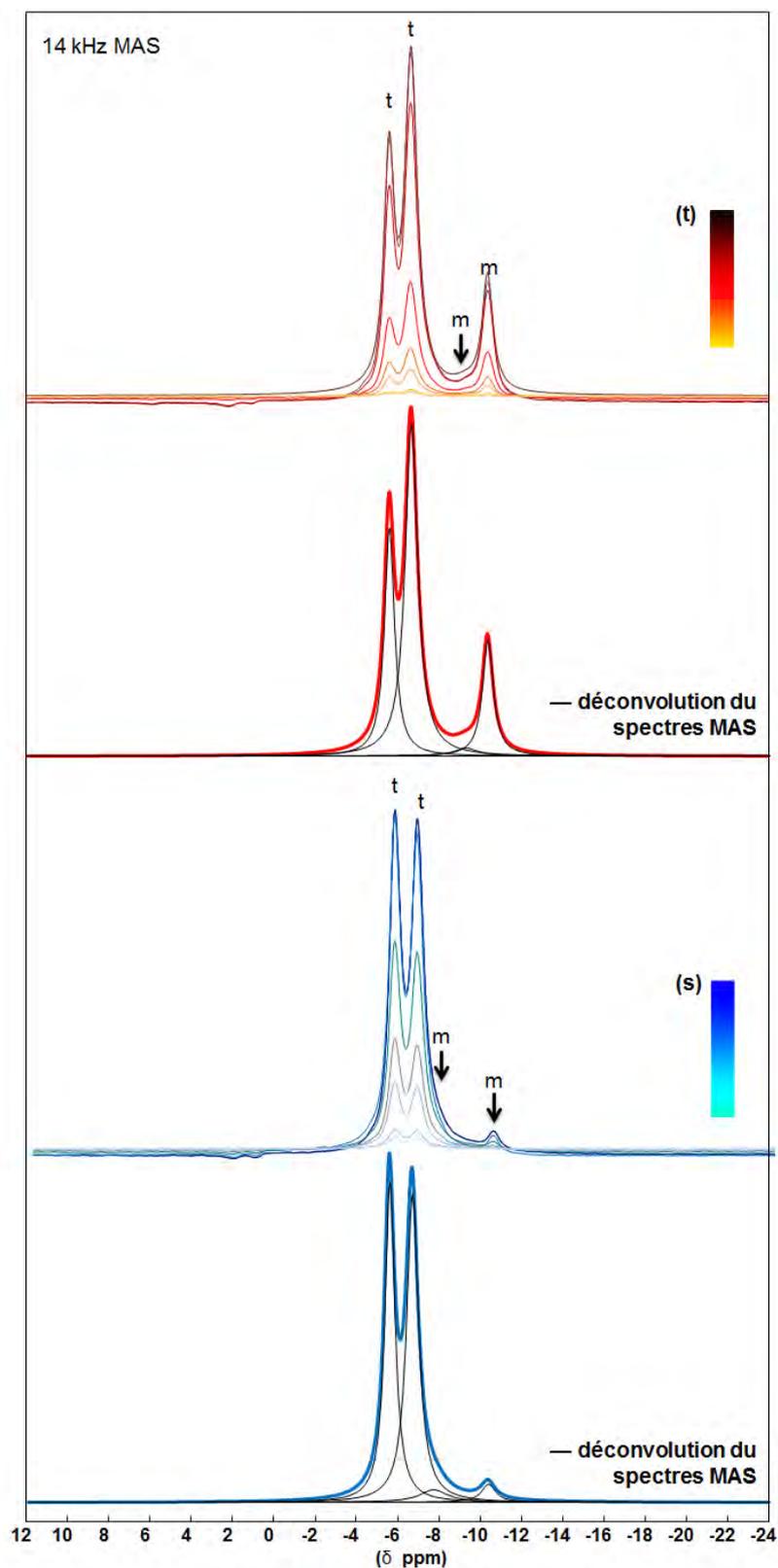


Figure II-24- Spectres RMN ^{31}P MAS (découplé ^1H lors de l'acquisition) des échantillons synthétisés en présence de $1,00\text{ mM Mg}^{2+}$ introduit dans la solution tampon (t) ou dans la solution de réactif de calcium (s). Le délai de relaxation incrémenté après la séquence d'impulsions de saturation (1, 5, 10, 20, 30, 60, 120 et 180s) correspond aux spectres du bas vers ceux du haut (retour de l'aimantation ^{31}P). Les différentes composantes des spectres MAS sont repérées par les notations suivantes : t (t-CPPD), m (m-CPPD).

II-7-2 Cas des poudres synthétisées en présence d'additifs dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPD

Une étude structurale complémentaire par RMN du solide a été réalisée sur les échantillons synthétisés afin d'approfondir l'interprétation sur le rôle des additifs ioniques dans la précipitation de la phase m-CPPD. Les échantillons considérés dans cette étude RMN sont ceux ayant montré les effets les plus prononcés sur la formation de la phase m-CPPD (paragraphe II-5-3), à savoir les cas du Cu^{2+} et Mg^{2+} (protocoles s et t) ainsi que celui du Fe^{3+} (protocole s).

Le spectre ^{31}P MAS de la phase m-CPPD de référence (sans additif) est présenté sur la Figure II-25. Comme observé précédemment par Gras *et al.* (Gras *et al.*, 2016a), la phase m-CPPD (notée m sur la Figure II-25) est caractérisée par deux pics fins situés à $-5,98$ et $-9,92$ ppm. L'observation de deux résonances du ^{31}P est en accord avec les données cristallographiques reportées dans la littérature (Gras *et al.*, 2016a). Une étude plus détaillée de ce spectre permet d'observer la présence de deux composantes minoritaires à $-4,95$ et $-9,79$ ppm. Elles correspondent respectivement aux phases t-CPPD et a-CPP (notées t et a sur la Figure II-25), (la phase t-CPPD est également caractérisée par une seconde résonance à $-6,24$ ppm, qui dans le cas présent est superposée à l'un des pics de la phase m-CPPD). Ces phases secondaires ont été considérées comme négligeables par la suite.

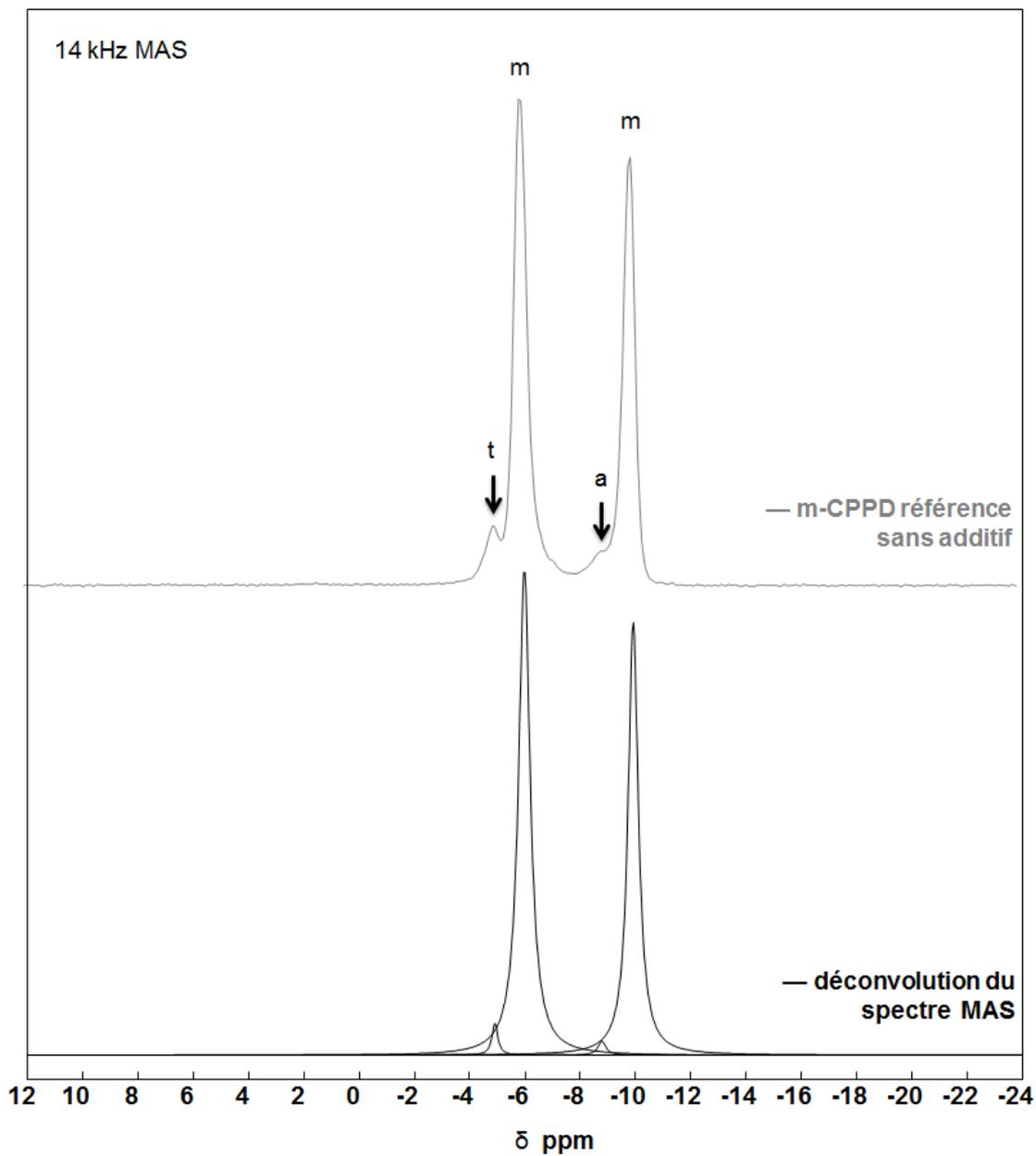


Figure II-25 - Spectres RMN ^{31}P MAS (découplé ^1H lors de l'acquisition) de la phase m-CPPD prise comme référence (synthétisée sans additif). Les différentes composantes des spectres MAS sont repérées par les notations suivantes : t (t-CPPD), m (m-CPPD), et a (a-CPP).

Tableau II-13- Temps de relaxation $T_1(^{31}\text{P})$ mesurés par saturation-retour pour chaque pic identifié sur les spectres RMN ^{31}P MAS des échantillons synthétisés dans les conditions d'obtention de la phase m-CPPD en présence d'ions Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} ou Mg^{2+} introduits dans la solution de réactif de calcium (s) ou dans la solution tampon (t). Les déplacements chimiques isotropes, les largeurs de pics et les proportions molaires relatives sont également reportés. Notations utilisées : t : t-CPPD, m : m-CPPD, a : a-CPP.

Echantillons précipités en présence d'additifs cationiques	Déplacement chimique δ (^{31}P) (ppm)				
	Largeur de pic (ppm)				
Composantes	Temps de relaxation T_1 (^{31}P) (s)				
	Aire (pourcentage relatif) (%)				
	m	m	t	a	a
1 mM [Cu^{2+}] (s)	- 5,98	- 9,91	-	-8,81	-6,53
	0,57	0,55	-	1,24	~ 4
	< 1	< 1	-	-	-
	33	31	-	5	31
1 mM [Cu^{2+}] (t)	- 5,98	- 9,91	- 4,91	- 8,83	-
	0,60	0,50	0,36	0,99	-
	< 1	< 1	-	-	-
	54	41	2	3	-
1 mM [Fe^{3+}] (s)	-5,97	-9,94	-	-8,85	-6,59
	0,51	0,48	-	~ 2	~ 5
	< 1	< 1	-	-	< 1
	23	21	-	6	50
1 mM [Mg^{2+}] (s)	-6,02	-9,94	-	-8,73	-6,53
	0,55	0,52	-	1,18	~ 3
	$6,6 \pm 1,2$	$6,0 \pm 1,0$	-	-	< 1
	34	31	-	6	29
1 mM [Mg^{2+}] (t)	- 6,00	-9,92	-4,97	-8,78	-7,19
	0,57	0,49	0,48	0,88	1,67
	$7,01 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,1$	-	-	-
	49	37	4	4	6

II-7-2-1 Cas des échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+}

Les spectres ^{31}P MAS des échantillons obtenus en présence de 1,00 mM de Cu^{2+} initialement présents soit dans la solution tampon (t) soit dans la solution de réactif (s) sont présentés sur la Figure II-26. Lorsque l'on compare ces spectres avec ceux de référence du t-CPPD (sans additifs) et du m-CPPD et a-CPP 100% pure, il apparaît que les spectres des échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+} sont principalement composés de phase m-CPPD, ce qui confirme les données de DRX (Tableau II-6 et Tableau II-7). Les déplacements chimiques isotropes ^{31}P sont centrés sur $-5,98$ et $-9,91$ ppm comme pour la phase m-CPPD de référence (Tableau II-13). Une déconvolution des spectres est également présentée sur la Figure II-26. Dans le cas du protocole (t), la phase t-CPPD y est présente en tant que composante mineure, ainsi qu'une composante beaucoup plus large qui pourrait être attribuée

à une phase amorphe. Comme dans l'étude de la phase t-CPPD, et dans le cas du protocole (s), deux composantes beaucoup plus larges sont présentes et pourraient être attribuées une fois encore à une phase amorphe.

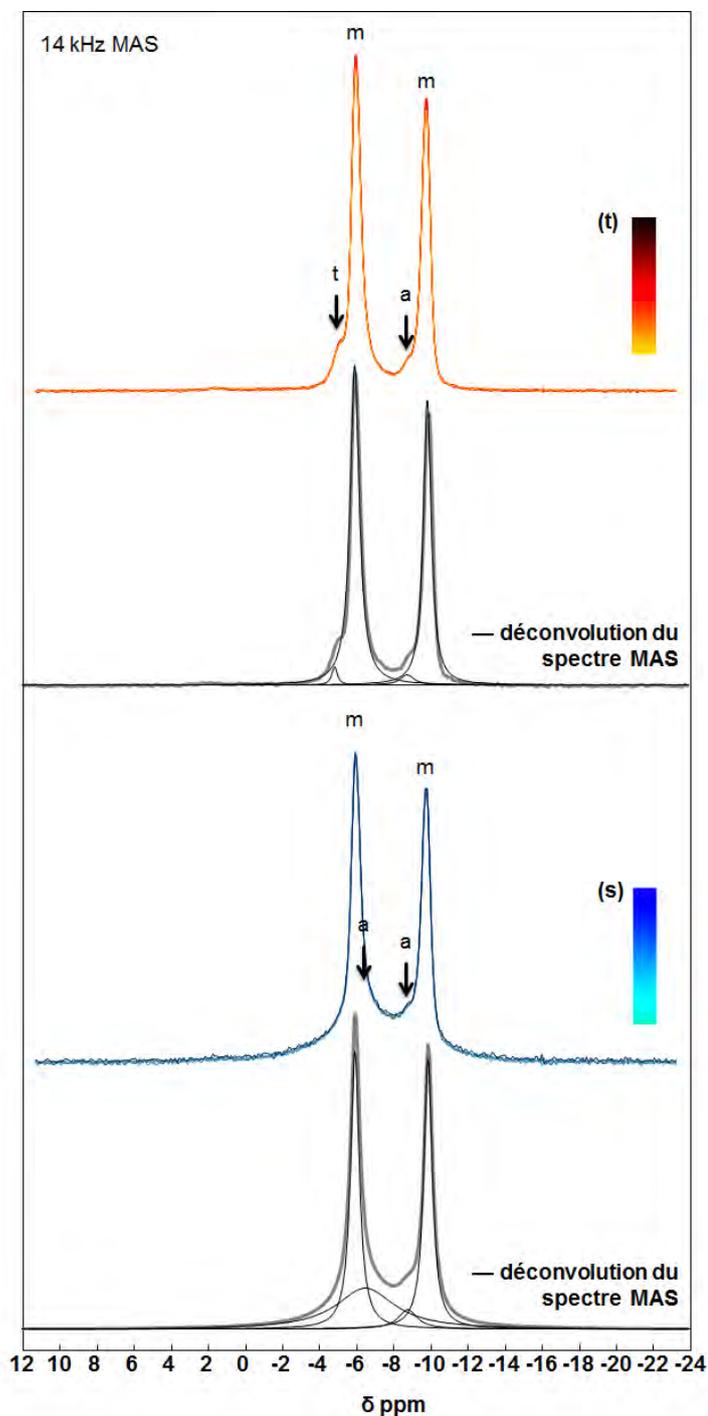


Figure II-26- Spectres RMN ^{31}P MAS (découplé de ^1H lors de l'acquisition) des échantillons synthétisés en présence de $1,00\text{ mM}$ de Cu^{2+} introduit dans la solution tampon (t) ou dans la solution de réactif de calcium (s). Le délai de relaxation incrémenté après la séquence d'impulsions de saturation (1, 5, 10, 20, 30, 60, 120 et 180s) correspond aux spectres du bas vers ceux du haut (retour de l'aimantation ^{31}P). Les différentes composantes des spectres MAS sont repérées par les notations suivantes : t (t-CPPD), m (m-CPPD), et a (a CPP).

Compte tenu des valeurs de $T_1(^{31}\text{P})$ observées (Tableau II-13), nous nous sommes concentrés ici uniquement sur la phase majoritaire, le m-CPPD, et avons constaté que $T_1(^{31}\text{P})$ était inférieur à 1 s, soit une valeur très faible, que ce soit pour le protocole (s) ou (t). En comparaison avec la phase m-CPPD de référence (100% pure), une réduction drastique du temps de relaxation longitudinale du ^{31}P est observée ($T_1(^{31}\text{P})_{\text{m-CPPD}} = 96,0$ s). Elle peut être attribuée à la présence de cations paramagnétiques Cu^{2+} dans la structure du m-CPPD. Comme expliqué lors de l'étude par RMN des phases synthétisées dans les conditions d'obtention de la phase t-CPPD, la présence d'ions paramagnétiques favorise la relaxation nucléaire.

Bien que présent en tant que composante mineure, $T_1(^{31}\text{P})$ s \cong 4 s a été estimé pour la composante a-CPP. Aucune tentative n'a été faite pour extraire les données de $T_1(^{31}\text{P})$ pour les phases t-CPPD (t) et pyrophosphate amorphe (a), étant donné que les intensités leur correspondant étaient très faibles.

II-7-2-2 Cas des échantillons synthétisés en présence de Fe^{3+}

Les spectres de RMN ^{31}P MAS des échantillons obtenus en présence de 1,00 mM de Fe^{3+} initialement présents dans la solution tampon (t) sont présentés sur la Figure II-22. Toutes les données de déplacements chimiques isotropes et $T_1(^{31}\text{P})$ sont reportées dans le Tableau II -13. Des similitudes avec les résultats concernant les échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+} (protocole s) sont observées mais avec des proportions molaires qui semblent être différentes. On note la présence d'une composante à $-5,6$ ppm caractéristique de la phase a-CPP et de deux pics fins à $-5,97$ et $-9,94$ ppm caractéristiques de la présence de la phase m-CPPD (Figure II-26). Les phases m-CPPD et a-CPP sont donc les phases principales constituant cet échantillon, ce qui est en accord avec les données de DRX (Tableau II-6 et Tableau II-7).

Nous avons vu précédemment que l'ion Fe^{3+} inhibe fortement la cristallisation des phases de CPPD (m et t) lorsqu'il est introduit dans le milieu de précipitation selon le protocole (t). Comme observé dans le cas des échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+} , qu'ils aient été synthétisés dans les conditions d'obtention de la phase m- ou t-CPPD (Figure II-21) ou de Fe^{3+} (Figure II-22 et Figure II-27), une diminution drastique du $T_1(^{31}\text{P})$ a été observée pour les deux phases m-CPPD et a-CPP. En présence de Fe^{3+} (protocole s) la relaxation est presque immédiate puisque $T_1(^{31}\text{P})$ est inférieur à 1 s pour la phase m-CPPD

comme pour l'a-CPP. Cela montre à nouveau que les cations Fe^{3+} se sont probablement insérés dans la maille du m-CPPD et dans la phase a-CPP.

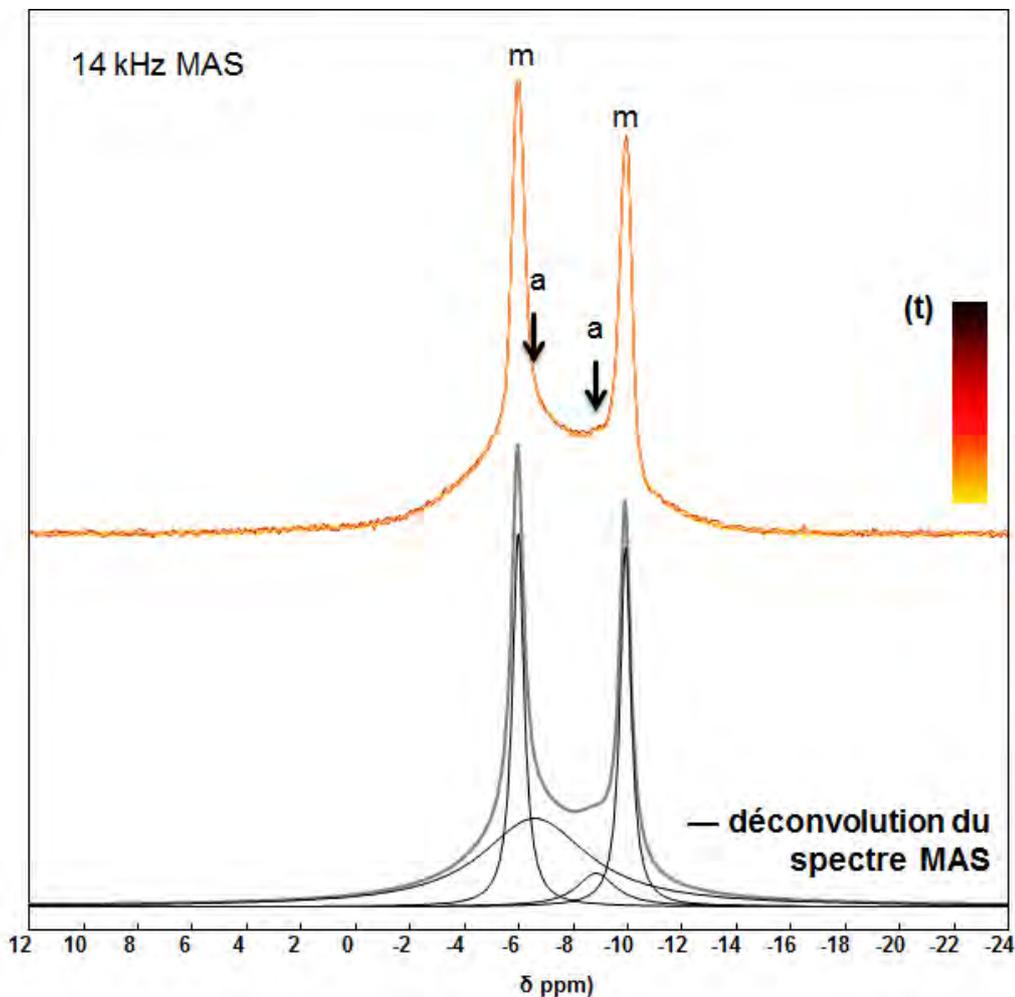


Figure II-27- Spectres RMN ^{31}P MAS (découplé ^1H lors de l'acquisition) des échantillons synthétisés en présence de 1,00 mM de Fe^{3+} introduit dans la solution tampon (t). Le délai de relaxation incrémenté après la séquence d'impulsions de saturation (1, 5, 10, 20, 30, 60, 120 et 180s) correspond aux spectres du bas vers ceux du haut (retour de l'aimantation ^{31}P). Les différentes composantes des spectres MAS sont repérées par les notations suivantes : m (m-CPPD et a (a-CPP).

II-7-2-3 Cas des échantillons synthétisés en présence de Mg^{2+}

Les spectres RMN ^{31}P MAS des échantillons obtenus en présence de 1,00 mM de Mg^{2+} (espèces diamagnétiques) initialement présents dans la solution tampon (t) ou dans la solution de réactif de calcium (s) sont présentés sur la Figure II-28. Toutes les données de déplacements chimiques isotropes et $T_1(^{31}\text{P})$ sont reportées dans le Tableau II-13. Des

similitudes avec les résultats des échantillons synthétisés en présence de Cu^{2+} sont observées. En effet, la phase m-CPPD est clairement la phase principale entrant dans la composition de l'échantillon, mais avec une proportion molaire différente par rapport au cas mettant en jeu les ions Cu^{2+} . Ce résultat est en accord avec les données de DRX (Tableau II-3 et Tableau II-4). En outre, les proportions molaires des différentes phases indiquées dans le Tableau II-12 sont également en adéquation avec les données de DRX (Tableau II-3 et Tableau II-4) et confirment que la phase m-CPPD est obtenue majoritairement et que de l'a-CPP est présent en quantité non négligeable.

Dans le cas du protocole (s) en présence de Zn^{2+} , la contribution de la phase amorphe est caractérisée par deux composantes comme observé sur la Figure II-28. Cette observation a déjà été faite dans le cas du protocole (s) appliqué à Cu^{2+} mais aussi dans le cas des échantillons synthétisés dans les conditions d'obtention du t-CPPD en présence de Cu^{2+} (Figure II-21) ou de Zn^{2+} (Figure II-23) (protocoles s et t). En outre, une faible contribution attribuée à la phase t-CPPD atteste également de sa présence (protocole t).

Comme cela a déjà été observé précédemment, on note une réduction significative du temps de relaxation longitudinale $T_1(^{31}\text{P})$ des phases m-CPPD quel que soit le protocole d'introduction de l'additif utilisé (s ou t) et pour la phase a-CPP (< 1 s) (protocole s). Cependant, dans le cas de Zn^{2+} , tout effet de relaxation paramagnétique est exclu. Comme expliqué précédemment (paragraphe II-6-1) cela peut alors s'expliquer par l'incorporation des cations Zn^{2+} dans la structure de la phase m-CPPD ainsi que dans la phase a-CPP, conduisant à la création de défauts locaux et par conséquent à une diminution conséquente des valeurs de $T_1(^{31}\text{P})$.

Tout comme dans l'étude de la cristallisation de la phase t-CPPD, que la distribution de l'additif dans le réacteur combiné au niveau de sursaturation (Annexe 4 ; *Figure 4-2*) sont des paramètres cruciaux.

En ce qui concerne l'inhibition de la cristallisation du m-CPPD et du t-CPPD (selon le mode d'introduction) par les ions Cu^{2+} , Mg^{2+} ou Fe^{3+} , il peut y avoir une compétition entre la précipitation de pyrophosphate de cuivre, magnésium ou fer et du pyrophosphate de calcium ; les ions Cu^{2+} , Mg^{2+} et Fe^{3+} peuvent être adsorbés à la surface du cristal et bloquer une partie des sites de croissance (le rapport atomique, Cu/Ca varie entre 2,43% et 3,20%, Mg/Ca varie entre 1,86 % et 3,07% et Fe/Ca varie entre 2,68% et 2,99%, Tableau II-8). La première hypothèse ne peut être vraie, car les diffractogrammes RX des échantillons étudiés ne

présentent aucun décalage en abscisse des pics de Bragg. Il ne peut pas uniquement y avoir une adsorption d'additif ionique à la surface des cristaux de CPP puisqu'ils sont trop gros pour qu'un ion qui ne soit pas un proche voisin du ^{31}P puisse influencer son temps de relaxation longitudinale. Ces observations indiquent donc que les ions Cu^{2+} , Mg^{2+} ou Fe^{3+} se sont introduits dans la structure des phases d'a-CPP et m-CPPD présentes.

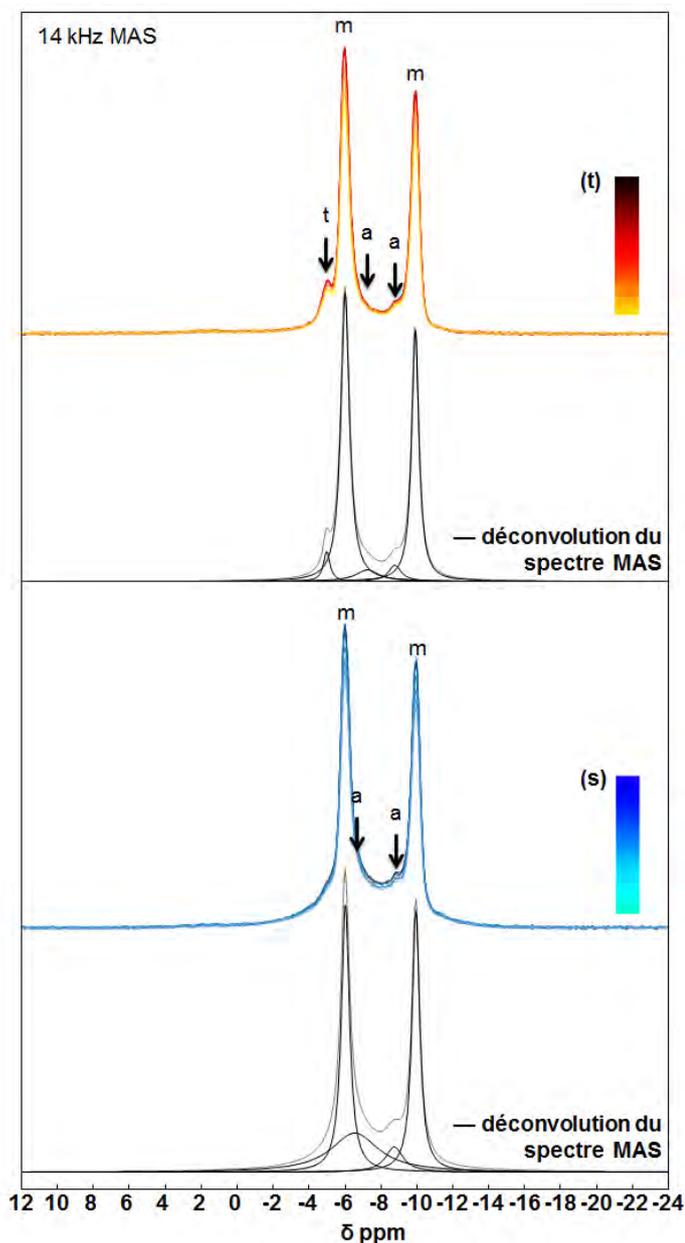


Figure II-28- Spectres RMN ^{31}P MAS (découplé ^1H lors de l'acquisition) des échantillons synthétisés en présence de 1,00 mM de Mg^{2+} introduit dans la solution tampon (t) ou dans la solution de réactif de calcium (s). Le délai de relaxation incrémenté après la séquence d'impulsions de saturation (1, 5, 10, 20, 30, 60, 120 et 180s) correspond aux spectres du bas vers ceux du haut (retour de l'aimantation ^{31}P). Les différentes composantes des spectres MAS sont repérées par les notations suivantes : t (t-CPPD), m (m-CPPD), et a (a-CPP).

II-8 Apport de l'étude à la problématique médicale

Rappelons que les phases m- et t-CPPD sont les phases ayant été identifiées *in vivo* et que nous cherchons au travers de cette étude *in-vitro*, à appréhender les mécanismes d'actions possibles de certaines espèces ioniques dans la formation de ces phases au potentiel inflammatoire notable.

Le milieu de précipitation est fortement sursaturé au début de la synthèse. Il est donc possible que la phase la plus instable (a-CPP) se forme en premier, puis évolue en m- ou t-CPPD. La formation d'une phase dihydratée au lieu d'une autre peut être la conséquence des cinétiques potentiellement modifiées par la présence d'additifs dans le milieu de précipitation. Cela semble être en adéquation avec le fait que *in-vitro*, la phase a-CPP peut être un précurseur des phases m- et t-CPPD. Une autre hypothèse serait que la phase cristalline dihydratée la moins stable (m-CPPD) pourrait se former en premier, puis évoluer vers la phase t-CPPD. Dans ce cas, les additifs ioniques étudiés ici stabiliseraient la phase m-CPPD en l'empêchant d'évoluer vers la phase t-CPPD. Cette hypothèse est compatible avec l'effet des cations Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} identifiés lors de cette étude. Ces ions favorisent la formation de m-CPPD au lieu de t-CPPD en remplaçant des ions Ca^{2+} dans la structure cristalline des phases CPPD. Cet effet est particulièrement prononcé pour des concentrations en ions initialement élevées au commencement de la précipitation des CPP (protocole t).

Les résultats de l'étude de la formation de m-CPPD en présence d'additifs ioniques ont montré et confirmé que les différents cations testés ont un effet inhibiteur partiel sur la formation de la phase m-CPPD et inhibent totalement la formation du peu de t-CPPD (protocole s) présent dans la référence (sans additif). Cependant, la formation d'a-CPP observée en présence de cations dans les conditions d'obtention du m-CPPD (cas du protocole s en particulier) n'est pas en faveur de l'hypothèse d'une potentielle stabilisation de la phase a-CPP en premier lieu qui évoluerait en m-CPPD. C'est pourquoi la seconde hypothèse indiquant que la présence d'ions Cu^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} orientent la formation de m-CPPD au dépend du t-CPPD via la substitution d'additifs aux ions Ca^{2+} et celle que nous retiendrons. Cette effet est certainement dû au fait que certains de ces ions Mg^{2+} (Souhassou et al., 1992) et Cu^{2+} (Effenberger, 1990) cristallisent généralement dans le système cristallin monoclinique (pyrophosphate de magnésium et pyrophosphate de cuivre).

Un potentiel d'excès en certains ions dans les articulations arthrosiques pourrait être précurseur et/ou un facteur aggravant de la formation de cristaux de CPPD et de la réponse

inflammatoire qui s'en suit. Pour explorer cette hypothèse, il pourrait être intéressant de mettre en corrélation des analyses médicales de compositions de fluides ostéoarticulaires chez des patients arthrosiques souffrant également de maladies causées par un déséquilibres ioniques, tels que les maladies de Menkès et/ou Wilson dues à des taux de cuivre anormaux dans le corps (McClure and Smith, 1983). En outre, l'utilisation des ions Fe^{3+} pour éviter la précipitation du CPPD pourrait être une piste à explorer dans des conditions physiologiques.

II-9 Conclusion

Les deux variétés polymorphes de pyrophosphate de calcium dihydraté (m-CPPD et t-CPPD : $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) identifiées dans les articulations de patients arthrosiques, sont connues pour être très inflammatoires. Comprendre leur formation et essayer de minimiser leur développement sont des pistes à explorer afin de trouver des méthodes de traitement originales permettant de réduire la douleur causée par la maladie ou même en guérir la cause.

Deux étapes principales ont été analysées lors de cette étude pour contribuer à cet objectif à long terme : la capacité à produire ces cristaux *in-vitro*, à l'extérieur du corps humain, pour étudier les phénomènes de germination et de croissance d'une part, et d'autre part, tester l'influence d'additifs ioniques d'intérêt biologique susceptibles d'avoir une action inhibitrice sur la cristallisation des phases CPPD.

Des synthèses en réacteur agité de précipitation classique sous conditions contrôlées (pH et température) ont été mises en œuvre pour élaborer quatre phases de pyrophosphate de calcium hydraté d'intérêt biologique, t-CPPD, m-CPPD, m-CPPT β et a-CPP, par addition simultanée, à débit contrôlé, des deux solutions de réactif (pyrophosphate de potassium et nitrate de calcium) dans une solution tampon d'acétate d'ammonium. Cette méthode rapide et reproductible permet de produire *in-vitro* des quantités suffisantes de composés permettant de réaliser une caractérisation exhaustive.

Les échantillons obtenus ont été caractérisés en détail à l'aide de la diffraction des rayons X, de la spectrométrie FTIR, de la résonance magnétique nucléaire du solide du ^{31}P , de la microscopie électronique à balayage et d'analyses élémentaires par spectrométrie à plasma à couplage inductif.

L'addition de différents additifs ioniques (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} ou $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) dans le réacteur au cours de la cristallisation des phases m- et t-CPPD et m-CPPT β a été

étudiée. Nous avons montré que certains de ces additifs ioniques ont un effet plus ou moins marqué sur la formation de ces phases.

Lorsque la phase de t-CPPD a été synthétisée en présence d'additifs ioniques, les résultats montrent qu'au lieu d'obtenir du t-CPPD quasiment pur, la phase m-CPPD se forme également pour tous les additifs ioniques testés, sauf dans le cas des faibles concentrations de Mg^{2+} . Un effet dose-dépendant a également été observé : plus la quantité d'additif dans le milieu de précipitation est élevée, plus la proportion de m-CPPD formé dans le mélange est importante. Par ailleurs, pour certains additifs, tels que les ions Zn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{3+} , la proportion relative de phase amorphe présente dans le mélange a significativement augmentée. L'additif peut également modifier la morphologie des particules obtenues et conduire à une agglomération des cristaux plus ou moins forte.

Lorsque les phases de m-CPPD et m-CPPT β ont été synthétisées en présence d'additifs ioniques, les résultats montrent que les ions Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} et Fe^{3+} , inhibent faiblement ou partiellement la formation de la phase m-CPPD et inhibent partiellement ou totalement la formation de la phase m-CPPT β sans modifier la morphologie des particules. En revanche, dans tous les cas, la présence d'ions $S_2O_3^{2-}$ dans le milieu de précipitation n'a pas d'effet notable sur la formation des CPP.

L'analyse par RMN des produits formés a permis de faire progresser l'interprétation des modes d'action des additifs cationiques testés qui peuvent s'adsorber ou s'insérer dans le réseau cristallin des CPP. *In vitro*, la phase a-CPP et/ou m-CPPT β peuvent être un précurseur des phases m- et t-CPPD. Une des hypothèses avancées est que la phase cristalline la moins stable des phases dihydratées (m-CPPD) se forme en premier, puis évolue en t-CPPD. Dans ce cas, les additifs ioniques étudiés ici stabiliseraient la phase m-CPPD et l'empêcheraient d'évoluer vers du t-CPPD. Il est clair cependant que cela ne résoudrait pas la problématique de la formation de cristaux phlogogènes, puisque la phase m-CPPD est la plus inflammatoire mais il s'agit probablement d'une indication importante pour comprendre les raisons de l'apparition d'une phase de CPPD plutôt qu'une autre au sein les articulations arthrosiques.

Cette étude contribue à comprendre le rôle de faibles quantités d'additifs ioniques qui peuvent être présents et avoir un rôle dans la formation des cristaux de CPP impliqués dans la pseudogoutte, l'arthrose et dans les maladies associées comme l'hypomagnésémie (carence de magnésium), la maladie de Wilson (excès de cuivre) et/ou l'hémochromatose (excès de fer).

Chapitre - III

**Etude de la germination et de la croissance
cristalline de pyrophosphates de calcium
hydratés**

III-1 Introduction

Les méthodes classiques de cristallisation en solution pour lesquelles les concentrations et la sursaturation évoluent au cours du temps ne permettent pas d'évaluer précisément les vitesses de croissance cristalline. En outre dans le cas des pyrophosphates de calcium, les variations de sursaturation au cours de la croissance cristalline rendent la solution sursaturée métastable vis-à-vis des différentes phases de CPP moins solubles. Il n'existe à ce jour pas de courbes de solubilité établie pour les différentes phases de CPP cependant la solubilité de certaines de CPPD a été déterminée à pH 7 et à 37°C dans divers fluides comme reporté au paragraphe I-5-2-2 (McCarty et al., 1971). Les pKs des phases t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT β déterminées par Christoffersen *et al.* (Christoffersen et al., 2000) sont très proches (Tableau III-1). C'est pourquoi les zones de métastabilité de ces phases de CPP sont très proches et peuvent s'entrecouper ce qui rend la croissance d'une phase pure de CPP difficile à contrôler lorsque la concentration et le pH évoluent. Afin de s'affranchir de ces problèmes inhérents aux méthodes classiques Nancollas *et al.* (Tomson and Nancollas, 1978) ont mis au point la méthode de croissance cristalline à composition constante (CCCC ou C4). La particularité de cette technique réside dans le maintien constant de la composition de la solution sursaturée à partir de laquelle la cristallisation a lieu. Ce maintien à composition constante assurera alors le maintien d'une sursaturation constante vis-à-vis de la phase de CPP étudiée.

Le premier objectif de cette étude est de mettre en œuvre la technique de croissance cristalline à composition constante et de l'appliquer à l'étude de la cristallisation de CPPD qui n'a que très rarement été abordée dans la littérature (Christoffersen et al., 2001), (Christoffersen et al., 2000), afin d'apporter des données cinétiques et thermodynamiques originales. Le second objectif est d'étudier la cristallisation homogène de t-CPPD sur une semence de t-CPPD à l'aide de cette technique. Le troisième objectif est l'étude de l'effet d'additifs sur la cristallisation homogène de t-CPPD en solution à composition constante, en complément de l'étude du chapitre II. Et enfin, le dernier objectif est de concevoir et de tester la faisabilité de dispositifs de cristallisation intégrant des matériels biologiques (ménisques).

La caractérisation des cristaux obtenus notamment par microscopie électronique à balayage et spectroscopie FTIR pourra aider à mettre en évidence l'action des additifs ioniques sur la croissance des CPPD pouvant conduire à la formation d'une phase plutôt qu'une autre.

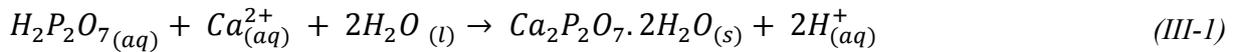
Dans un premier temps, la méthode de croissance cristalline à composition constante (C4) utilisée pour réaliser cette étude sera décrite. Bien que cette méthode ait plus d'une fois été mise en œuvre avec succès notamment lors d'étude de la cristallisation de phosphates de calcium (Koutsoukos et al., 1980), (Jw et al., 1985), (Combes, 1996), (Tang et al., 2003) elle n'a encore jamais été utilisée dans le cas des pyrophosphates de calcium. Ainsi dans un deuxième temps, nous étudierons la cristallisation homogène des trois phases de CPP hydratés d'intérêt (t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT β) à la surface de semences de la phase étudiée à l'aide de la C4 et pour chacune de ces phases, nous chercherons à déterminer le mécanisme de croissance cristalline prépondérant à partir des données cinétiques obtenues. Nous étudierons ensuite dans le cas du t-CPPD l'influence d'additifs ioniques sur le mécanisme de croissance de ces cristaux. Enfin, une étude préliminaire basée sur la mise au point d'un dispositif et d'une méthodologie permettant d'étudier la précipitation de CPP en présence de matériels biologiques (ménisques) sera présentée. Cette dernière partie a pour but d'ouvrir de nouvelles voies pour approfondir l'étude de l'effet d'additifs ioniques sur la formation de CPP dans des conditions proches de celles observées *in-vivo*.

III-2 La méthode de croissance cristalline à composition constante

III-2-1 Principe de la méthode

La méthode de croissance cristalline à composition constante (C4) permet l'étude de la cristallisation notamment d'orthophosphate ou de carbonate de calcium à (Kazmierczak et al., 1982) (Nancollas and Zawacki, 1989) partir d'une solution sursaturée métastable dont la composition (pH, température, force ionique et sursaturation) reste constante tout au long de l'expérience et qui aura étéensemencée par des cristaux du composé étudié. Pour la première fois, nous allons chercher à appliquer cette méthode au cas des pyrophosphates de calcium ; ce travail a été initié en collaboration avec le Pr P. Koutsoukos de l'Université de Patras (Grèce). L'organigramme du principe de fonctionnement de cette technique est présenté sur la Figure III-1. L'introduction de la semence dans la solution sursaturée métastable par rapport à différentes phases de CPP induit la formation de l'une d'entre elle qui dépend de l'aptitude de la semence à initier les premiers germes. La croissance cristalline alors initiée consomme des ions Ca^{2+} et $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ pour former un CPP hydraté ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) comme décrit par l'équation (III-1). La consommation d'ions pyrophosphate initialement complexés avec des H^+ en

solution induit la libération de ces derniers conduisant alors à une diminution du pH de la solution sursaturée.



L'ajout de solutions titrantes cationique et anionique permet d'une part, de ramener le pH à sa valeur de consigne initiale et d'autre part de maintenir constantes les concentrations en ions calcium et pyrophosphate en solution et donc la force ionique et la sursaturation de la solution. Les notions de sursaturations et de solubilité ont déjà été abordées dans le chapitre I. Cependant, nous rappellerons dans le paragraphe « conditions expérimentales » (Tableau III-1) les valeurs des produits de solubilité des CPP. Ces produits de solubilité sont primordiaux pour cette étude puisqu'ils permettront de déterminer les concentrations pour lesquelles la solution de travail est sursaturée ou non vis-à-vis d'une phase de CPP. Il sera ensuite possible de calculer le temps d'induction et la vitesse initiale de croissance cristalline à partir de l'enregistrement du volume d'ajout des titrants en fonction du temps.

III-2-2 Dispositif expérimental

Il est nécessaire d'utiliser un matériel sensible pour obtenir une mesure précise de l'évolution du pH au cours du temps qui est le paramètre majeur qui permettra de suivre le processus de germination et de croissance cristalline. Le schéma du montage expérimental est présenté sur la Figure III-2. Ce montage est constitué d'un réacteur double enveloppe de précipitation classique de 250 mL, thermostaté par une circulation d'eau à 37°C, un pH mètre, un impulsomètre, deux burettes de titrants, le tout couplé à un système d'enregistrement informatique des données. Les changements de pH sont détectés par une électrode combinée de pH. La solution est sous agitation (300 tr.min⁻¹) suffisante pour que toutes les particules de semence restent en suspension dans la solution sursaturée tout au long de l'expérience.

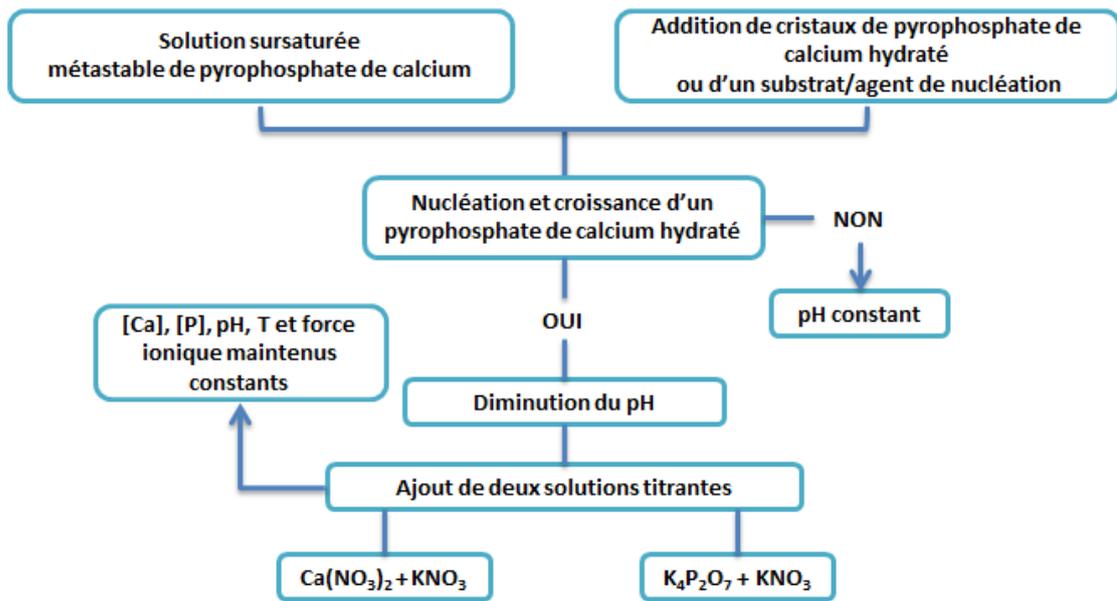


Figure III-1- Organigramme du principe de fonctionnement de la technique de croissance cristalline à composition constante adapté au cas de l'étude des phases de CPP hydraté.

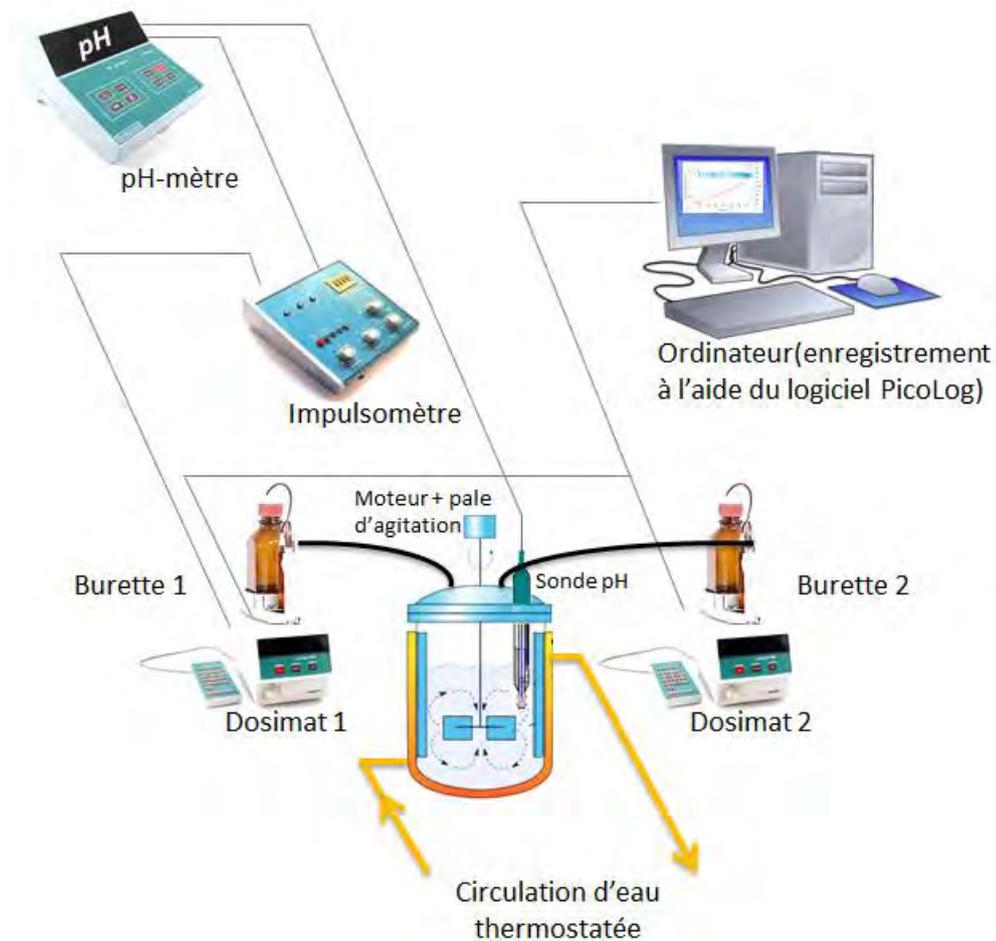


Figure III-2- Représentation schématique du montage expérimental de croissance cristalline à composition constante.

III-2-3 Les conditions expérimentales

III-2-3-1 La solution de travail

Il est important de noter que comme dans le cas des phosphates de calcium et contrairement à la plupart des solides minéraux, les isothermes de solubilité des différents pyrophosphates de calcium hydratés sont déplacés vers les faibles solubilités quand la température augmente (solubilité rétrograde ; (Sakamoto, 1995)). De plus, il est connu depuis longtemps que des facteurs tels que le stress mécanique ou l'âge entraîne notamment la diminution du pH de différents fluides biologiques chez les patients arthrosiques. Jebens et Monk-Jones (Jebens and Monk-Jones, 1959) ont montré que le pH moyen du sang et des fluides synoviaux diminue au fur et à mesure que des facteurs tels que l'âge ou le fait d'être atteint d'arthrose augmente. Le pH moyen du fluide synovial d'un adolescent sain de moins de 20 ans est $8,10 \pm 0,13$ et celui d'un adulte sain entre 30 et 40 ans est de $7,77 \pm 0,16$. Pour un adulte entre 30 et 40 ans atteint d'arthrose, le pH moyen de son fluide synovial diminue jusqu'à $7,60 \pm 0,05$ en moyenne et $7,49 \pm 0,09$ lorsqu'il a entre 70 et 78 ans. Quant au pH sanguin, il est de l'ordre $7,38 \pm 0,03$ pour un adulte. Toutes les valeurs de pH qui viennent d'être citées sont les valeurs moyennes d'une gamme de pH qui s'étend de 6 à 9 sur les histogrammes des pH sanguins et de liquides synoviaux en fonction de la catégorie (sain, traumatique ou arthrosique) dans laquelle se classent les patients considérés. Dans notre choix de pH pour l'étude que nous avons mené, nous avons tenu compte de cette tendance du pH à diminuer dans le cadre de l'arthrose et du fait qu'on s'attend à un pH légèrement acide dans un contexte pathologique ou traumatique inflammatoire. Par ailleurs, il est expérimentalement difficile de stabiliser le pH de la solution de travail proche de la valeur du pH neutre (7). Or la stabilisation du pH est une étape essentielle à la réalisation d'un essai de C4. C'est pourquoi nous nous sommes placés à pH 6,22 proche de l'extrémité de la gamme de pH observé dans l'étude de Jebens et Monk-Jones (Jebens and Monk-Jones, 1959).

III-2-3-2 Les solutions titrantes

Les sels utilisés pour la réalisation de la solution sursaturée de travail et des solutions titrantes sont : $K_4P_2O_7$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ mais aussi HNO_3 et KNO_3 qui permettent respectivement d'ajuster le pH et la force ionique. Les concentrations des solutions titrantes sont déterminées en fonction des concentrations dans la solution de travail selon les calculs décrits dans l'annexe n°3 en pour permettre un maintien constant de la composition de la

solution de travail sursaturée métastable. Les concentrations en ions calcium et pyrophosphate dans la solution de travail sont calculées en fonction du choix de la sursaturation relative par rapport à la phase de CPP étudiée (Tableau III-2) ou du diagramme des isothermes de solubilité représentés sur la Figure III-3, pour une température de 37°C et un pH égal à 6,22. Toutes les solutions utilisées ont été filtrées sur des filtres millipores ($\text{\O} = 0,45 \mu\text{m}$) afin d'éliminer toutes poussières ou particules solides pouvant jouer le rôle de germes de cristallisation (hétérogène). Toutes les expériences qui seront décrites par la suite ont été réalisées dans ces conditions (37°C et pH 6,22).

III-2-3-3 Données de solubilité

L'utilisation de la méthode C4 nécessite que la solution métastable de travail soit préparée à un degré de sursaturation suffisamment faible pour que la précipitation ne soit pas spontanée, ni trop rapide et puisse surtout être suivie pendant une durée raisonnable (maximum 24 h). Les calculs de ces sursaturations relatives en fonction de la température, du pH, de la concentration en ions dans la solution de travail et le calcul du produit ionique ont été faits selon la méthode décrite au paragraphe I-5-3 utilisant le logiciel PREEQC et une base de données tenant compte des constantes d'association et de dissociation ainsi que des produits de solubilité de chacune des phases cristallisées de CPP. Le Tableau III-1 regroupe les produits de solubilité à 37°C de phases cristallines de CPP d'intérêt biologique. Les indices de sursaturation (SI) de la solution de travail vis-à-vis des différentes phases de CPP pour des concentrations variables en ions calcium et pyrophosphate telles que $(\text{Ca/P})_{\text{sol.}} = 1$ sont répertoriés dans le Tableau III-2. D'après les données du Tableau III-2 la solution de travail n'est sursaturée que vis-à-vis de la phase t-CPPD, pour des concentrations en calcium comprises entre $1,23 \cdot 10^{-4}$ et $1,70 \cdot 10^{-4}$ M. Il s'agit de la seule gamme de concentrations (étroite) pour laquelle il est certain de ne faire croître que du t-CPPD. Pour des concentrations en calcium comprises entre $1,80 \cdot 10^{-4}$ et $2,30 \cdot 10^{-4}$ M, la solution de travail n'est sursaturée que vis-à-vis des phases m- et t-CPPD, il s'agit donc de la seule gamme de concentrations (étroite) pour laquelle il est possible de faire croître du m-CPPD sur une semence de m-CPPD. Rappelons que la phase m-CPPD est plus instable que la phase t-CPPD. Et enfin, pour des concentrations en calcium supérieures à $2,70 \cdot 10^{-4}$ M, la solution de travail est sursaturée vis-à-vis des deux phases de CPPD mais aussi de la phase m-CPPT β . Étant donné que la phase m-CPPT β est la plus instable, elle précipite systématiquement dans une solution de travail sursaturée en m-CPPT β .

Tableau III-1- Valeurs de pK_s des phases cristallines de CPP à 37°C déterminées par Christoffersen et al. (Christoffersen et al., 2000).

Pyrophosphates de calcium	pK_s
t-CPPD	18,35
m-CPPD	17,6
m-CPPT β	17,1

Tableau III-2- Indices de sursaturation SI et sursaturation relative σ associées, de la solution de travail vis-à-vis de différentes phases cristallisées de CPP pour des concentrations variables en ions calcium et pyrophosphate telles que $(Ca/P)_{sol.} = 1$.

[Ca] M	SI_{t-CPPD}	σ_{t-CPPD}	SI_{m-CPPD}	σ_{m-CPPD}	$SI_{m-CPPT \beta}$	$\sigma_{m-CPPT \beta}$
$1,07 \cdot 10^{-4}$	0,10	1,26	-0,65	0,22	-1,15	0,07
$1,12 \cdot 10^{-4}$	0,18	1,51	-0,57	0,27	-1,07	0,09
$1,23 \cdot 10^{-4}$	0,30	2,00	-0,45	0,35	-0,95	0,11
$1,34 \cdot 10^{-4}$	0,40	2,51	-0,35	0,45	-0,85	0,14
$1,42 \cdot 10^{-4}$	0,48	3,02	-0,27	0,54	-0,77	0,17
$1,50 \cdot 10^{-4}$	0,54	3,50	-0,18	0,66	-0,68	0,21
$1,70 \cdot 10^{-4}$	0,71	5,13	-0,04	0,91	-0,54	0,29
$1,80 \cdot 10^{-4}$	0,78	6,03	0,03	1,07	-0,47	0,34
$1,94 \cdot 10^{-4}$	0,85	7,08	0,10	1,26	-0,40	0,40
$2,30 \cdot 10^{-4}$	1,09	12,30	0,34	2,19	-0,16	0,69
$2,70 \cdot 10^{-4}$	1,28	19,05	0,53	3,39	0,03	1,07
$3,00 \cdot 10^{-4}$	1,42	26,30	0,67	4,68	0,17	1,48
$3,50 \cdot 10^{-4}$	1,59	38,90	0,84	6,92	0,34	2,19
$4,00 \cdot 10^{-4}$	1,78	60,26	1,03	10,72	0,53	3,39
$5,00 \cdot 10^{-4}$	2,05	112,20	1,30	19,95	0,80	6,31
$7,00 \cdot 10^{-4}$	2,47	295,12	1,72	52,48	1,22	16,60

Par définition $SI = \log(\sigma)$, avec σ sursaturation relative de la phase de CPP concernée.

Rappelons que lorsque :

- $SI < 0$, la solution est sous-saturée vis-à-vis de la phase solide considérée qui ne peut donc pas précipiter.
- $SI = 0$, la solution est à l'équilibre vis-à-vis de la phase solide considérée.
- $SI > 0$, la solution est sursaturée vis-à-vis de la phase solide considérée qui peut donc précipiter.

La valeur de $1,70 \cdot 10^{-4}$ M ($SI_{t-CPPD} = 0,71$; $\sigma = 5,12$) étant la concentration en calcium la plus élevée permettant de n'être sursaturée que vis-à-vis de la phase t-CPPD (Tableau III-2), nous utiliserons des concentrations inférieures à celle-ci pour étudier la croissance du t-CPPD sur une semence de t-CPPD. Une variation de pH de 0,02 unité peut fait varier l'indice de sursaturation SI d'environ $\pm 0,03$ unité. Or on a constaté de manière expérimentale que la

variabilité du pH autour de sa valeur de consigne est de $\pm 0,01$ unité. C'est pourquoi, pour choisir de faire croître une phase en particulier nous nous sommes placés à une sursaturation relative σ supérieure ou égale à 1,26 correspondant à un $SI \geq 0,10$ ($[Ca] \geq 1,07 \cdot 10^{-4}$ pour $SI_{t-CPPD} \geq 0,10$; $[Ca] \geq 1,94 \cdot 10^{-4}$ pour $SI_{m-CPPD} \geq 0,10$; Tableau III-2), afin d'être sûr que de très faibles variations de pH ou température ne fassent pas basculer le système d'un état faiblement sursaturé à l'état d'équilibre.

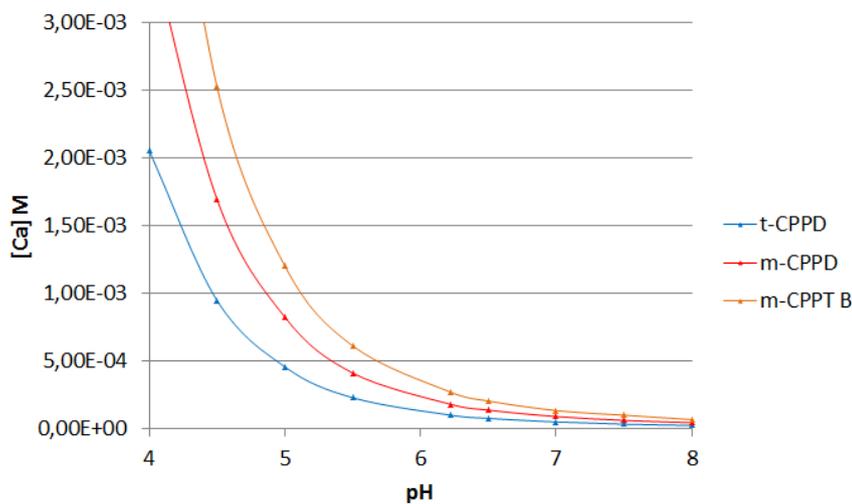


Figure III-3- Isothermes de solubilité des pyrophosphates de calcium à 37°C, pour une force ionique de 0,1M (Tracé en déterminant à un pH donné et à l'aide de PHREEQC (Chapitre I ; paragraphe I-5-3) les valeurs de concentrations pour lesquelles la solution de pyrophosphates de calcium (Ca/P=1) est à l'équilibre ($SI = 0$)).

III-2-3-4 Les semences

Les semences utilisées lors de cette étude sont des poudres de CPP hydratés purs qui ont été synthétisées selon la méthode de Gras *et al.* (Gras *et al.*, 2013a). Les poudres de m-CPPD et m-CPPT β (Figure 4-5 et Figure 4-6 ; annexe 4) présentent une distribution en taille monomodale et les poudres de t-CPPD et a-CPP (Figure 4-7 et Figure 4-8) présente une distribution bimodale avec 80% de tailles de particules distribuées autour du diamètre moyen. Le Tableau III-3 regroupe les diamètres moyens des particules déterminées par analyse granulométrique par diffraction laser ainsi que la surface spécifique des particules déterminées par la méthode BET.

Tableau III-3 – Surface spécifique et diamètre moyen des poudres de CPP synthétisées qui seront utilisées comme semences pour les expériences de C4

Pyrophosphates de calcium	Surface spécifique ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	diamètre moyen des particules (μm)
m-CPPD	$5,3 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,1$
t-CPPD	$1,2 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,1$
m-CPPT β	$5,4 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,1$
a-CPP	$23,7 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,2$

III-2-3-5 Moyens d'interprétation

Les poudres obtenues suite à des essais de C4 seront analysées par spectroscopie FTIR pour déterminer la ou les phase(s) présentes dans les échantillons. Les tracés des courbes du volume d'ajout des solutions titrantes en fonction du temps permettront de déterminer des paramètres cinétiques tels que le temps d'induction, la vitesse de croissance massique ainsi que le mécanisme de croissance mis en jeu. La manière de procéder pour déterminer ces paramètres et leur analyse est présentée dans la partie qui suit.

III-3 Résultats expérimentaux

III-3-1 Détermination des paramètres cinétiques

Dans la méthode de C4 la vitesse de croissance est déterminée par la quantité de matière déposée par unité de surface et par unité de temps (R_c en $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) (Tomson and Nancollas, 1978) comme par exemple dans le cas de l'étude des orthophosphates de calcium, (Combes, 1996), (Koutsoukos et al., 1980) (Amjad, 1991).

Un enregistrement expérimental type de C4 illustrant les volumes de solutions titrantes ajoutés au cours de l'expérience est présenté sur la Figure III-4.

On peut distinguer la présence d'au moins deux étapes :

- Une partie sans ajout qui correspond au temps d'induction τ qui correspond au temps de latence pour que la surface des cristaux devienne active.

- Une partie linéaire dont la pente $\Delta V/\Delta t$ permet de déterminer la vitesse initiale de croissance cristalline. Cette étape illustre la croissance des germes stables formés pendant la période d'induction.

Il est fréquent de distinguer sur une courbe de C4 une troisième étape représentée par une partie de la courbe souvent à l'allure exponentielle. La présence de cette troisième étape n'est cependant pas encore observée sur la courbe présentée dans la Figure III-4. Une telle étape témoigne d'une surface de contact solide-solution plus importante ce qui augmente le nombre de sites de croissance ce qui provoque l'emballement de la réaction de cristallisation. Présente ou non cette partie de la courbe ne sera pas exploitée dans cette étude.

C'est à partir des deux premières zones illustrant les étapes successives de germination et croissance cristalline que nous avons respectivement pu déterminer le temps d'induction τ et la vitesse initiale de croissance cristalline R_c . On considère que la croissance cristalline en présence de germes ajoutés, devient le phénomène prépondérant par rapport à la nucléation lorsque la quantité de titrants ajoutée pour compenser la consommation de matière devient égale à $V = 0,12$ mL ce qui correspond à 4 gouttes d'ajout de titrants (les 3 premières gouttes pouvant être ajoutées dans certains cas d'instabilité de pH initial et résulter ainsi simplement d'un artefact de l'expérience). Cette limite a été définie en corrélation avec l'observation en microscopie électronique à balayage du processus de croissance de cristaux dans le cas de la cristallisation de phosphates de calcium (Combes, 1996).

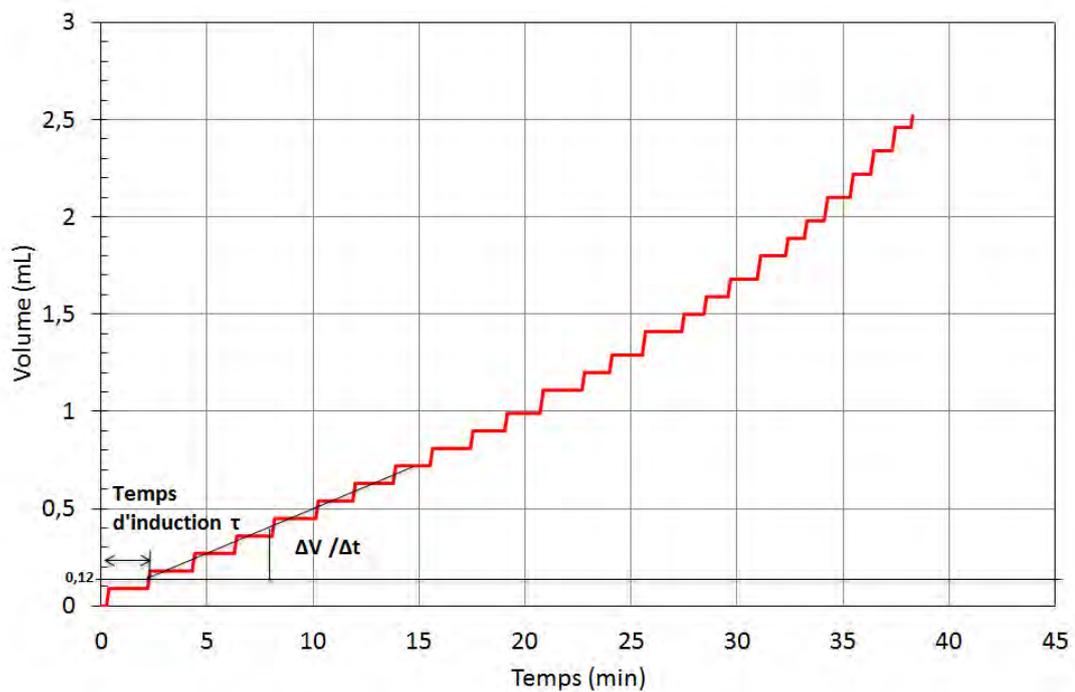


Figure III-4- Enregistrement expérimental classique du volume d'ajout des tirants en fonction du temps pour la croissance de t-CPPD sur t-CPPD dans une solution sursaturée métastable avec $[Ca] = [P] = 7,00 \cdot 10^{-4} M$, $T = 37^{\circ}C$ et $pH=6.22$.

La vitesse initiale de croissance R_c peut être calculée à partir de l'équation :

$$R_c = \frac{\Delta V}{\Delta t} \times \frac{C x_1}{m_{CPP} \times SS} \quad (III-2)$$

Avec Cx_1 est la concentration effective des solutions titrantes en mol.L^{-1} (cf. annexe n°3), $\frac{\Delta V}{\Delta t}$ la pente de la droite, m_{CPP} la masse de semence de CPP introduite dans le système et SS sa surface spécifique de la semence en $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (cf. Tableau III-3). La vitesse de croissance R_c est donc exprimée en $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ (mole de CPP formé par m^2 de semence de CPP par minute). Les expériences ont été en général triplées et l'erreur relative sur les mesures de τ et R_c est respectivement et globalement estimée à 30% au maximum.

III-3-2 Effet de la sursaturation : cas d'une semence de phase t-CPPD

L'influence de la sursaturation sur la cristallisation de t-CPPD à la surface de cristaux de t-CPPD et en particulier sur les deux paramètres cinétiques caractéristiques, τ et R_c , a été étudiée. Les solides recueillis suite aux essais de C4 ont été caractérisés par spectrophotométrie infrarouge afin de vérifier le type de phase formée en cohérence avec les conditions de sursaturation choisies.

Lors des essais à sursaturation $\sigma = 1,5$ nous avons noté la présence d'une légère augmentation de pH précédent l'ajout de solution titrantes et allant jusqu'à +0,02 unité pH. Au vu de la sensibilité des variations de sursaturation σ en fonction des variations de pH une telle augmentation indique qu'il serait difficile d'étudier la croissance cristalline de t-CPPD à plus basse sursaturation en parvenant à maintenir celle-ci constante. Or il est d'usage d'étudier la croissance cristaux par la technique de C4 pour des sursaturations comprises entre 0,2 et 2 ou 3 pour avoir la certitude d'étudier une cinétique de germination et croissance et non pas seulement de la germination secondaire. Il s'avère donc que se placer à de si faibles sursaturations dans le cas de CPP n'est pas faisable. Suite à des expériences préliminaires, nous avons pu définir l'ordre de grandeur de la valeur de σ correspondant à la limite haute de sursaturations relatives à partir de laquelle ce n'est plus la phase t-CPPD mais la phase m-CPPT β qui croît à la surface d'une semence de t-CPPD. Nous avons alors choisi de réaliser des essais de C4 pour une large gamme de sursaturations ($1,5 < \sigma < 295$) correspondant à des concentrations en calcium variant entre $1,12 \cdot 10^{-4}$ M et $7,00 \cdot 10^{-4}$ M afin d'identifier précisément la fenêtre optimale des conditions dans lesquelles il est possible de ne faire croître que des cristaux de t-CPPD sur une semence de t-CPPD. En effet les courbes de volume d'ajout des solutions titrantes en fonction du temps à différentes sursaturations sont représentées sur la Figure III-5. Les résultats cinétiques obtenus pour l'étude de la cristallisation de t-CPPD à la surface de cristaux de t-CPPD à partir d'expériences réalisées au moins en triplicat sont reportés dans le Tableau III-4. D'après les temps d'induction τ (min) et les vitesses initiales de croissance cristalline R_c ($\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) en fonction de la sursaturation relative dans la solution de travail et le type de la phase de CPP formée reportés dans le Tableau III-4 il apparaît que pour des concentrations comprises entre $1,12 \cdot 10^{-4}$ et $4,00 \cdot 10^{-4}$ M la phase qui croît est du t-CPPD pur. Pour des concentrations supérieures à $4,00 \cdot 10^{-4}$ M, la phase qui croît est du m-CPPT β pur. D'autre part, plus la concentration et la sursaturation dans la solution de travail sont élevées plus le temps d'induction diminue et la vitesse de croissance de la phase formée augmente.

Il apparaît sur la Figure III-5 que pour des sursaturations supérieures à $\sigma = 3,5$ il n'y a quasiment plus de temps d'induction ; ce dernier est de l'ordre de la minute (Tableau III-4). Lorsqu'un tel temps d'induction (très court) est observé ce dernier est considéré comme inexistant. Pour de fortes sursaturations relatives, au-delà de 26, l'allure des courbes obtenues change ; pour les temps les plus élevés une incurvation d'allure exponentielle apparaît (courbes en vert clair et foncé, sur la Figure III-5) ce qui peut être expliqué par le fait que la

vitesse d'intégration des ions du soluté au solide dépend alors de deux phénomènes simultanés: (i) la libération de molécules d'eau par les cations ; (ii) la diffusion des cations entre des positions voisines de sites du réseau cristallin (Nielsen, 1984).

La Figure III-6 présente les spectres FTIR réalisées sur les produits obtenus suite à des essais de C4 pour différentes sursaturations. La présence des bandes de vibration caractéristiques de la phase m-CPPT β ($\nu_{PO_3}^{as}$ à 1159 et 1007 cm^{-1} , ν_{POP}^{as} à 957 cm^{-1} et ν_{POP}^s à 736 cm^{-1}) sur les spectres FTIR des poudres obtenues après C4 pour des sursaturations supérieures à $\sigma = 60$ indique qu'il s'agit là de germination et croissance de m-CPPT β . Pour des sursaturations inférieures ou égales à $\sigma = 60$ les spectres FTIR des produits obtenus ne présentent que les bandes caractéristiques de la phase t-CPPD. C'est pourquoi nous n'étudierons par la suite que la croissance cristalline de t-CPPD sur une semence de t-CPPD pour des sursaturations comprises entre 1,5 et 60.

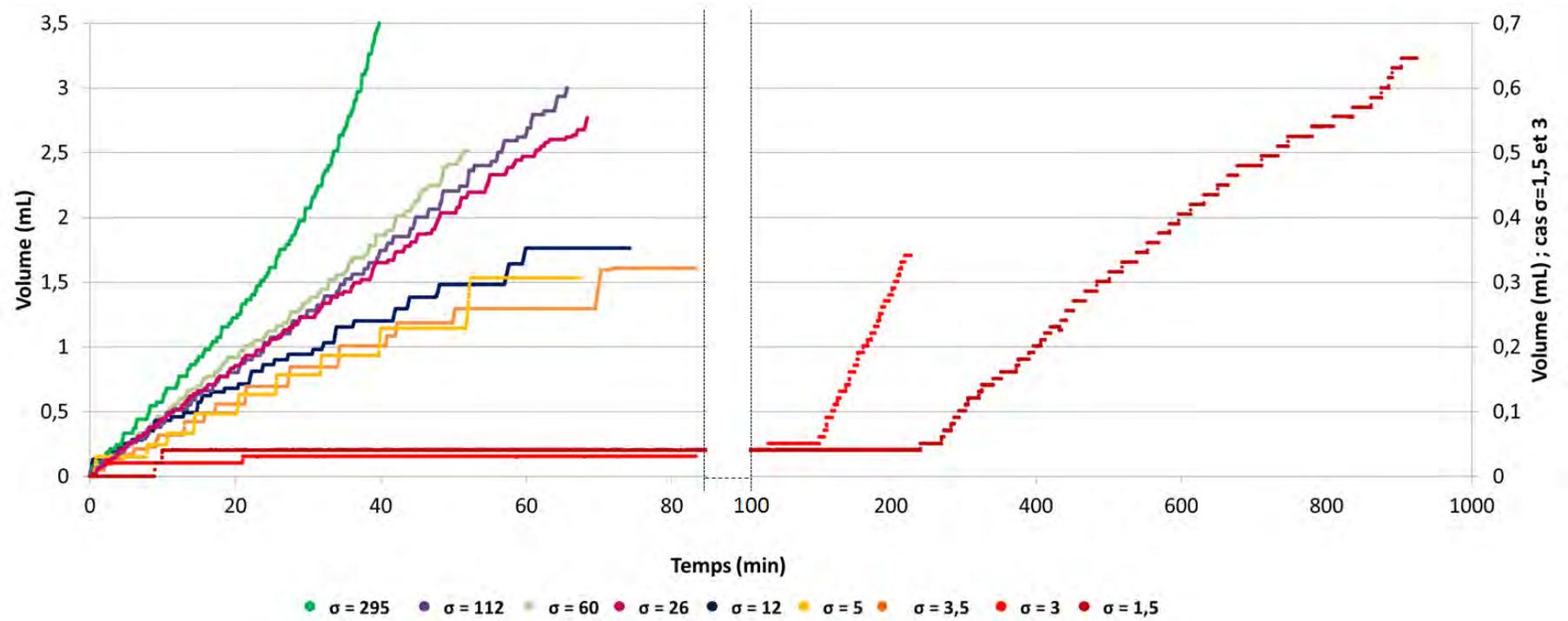


Figure III-5- Volume d'ajout des solutions titrantes en fonction du temps pour la germination et la croissance de t-CPPD sur une semence de t-CPPD à différentes sursaturations relatives (1.5 à 295).

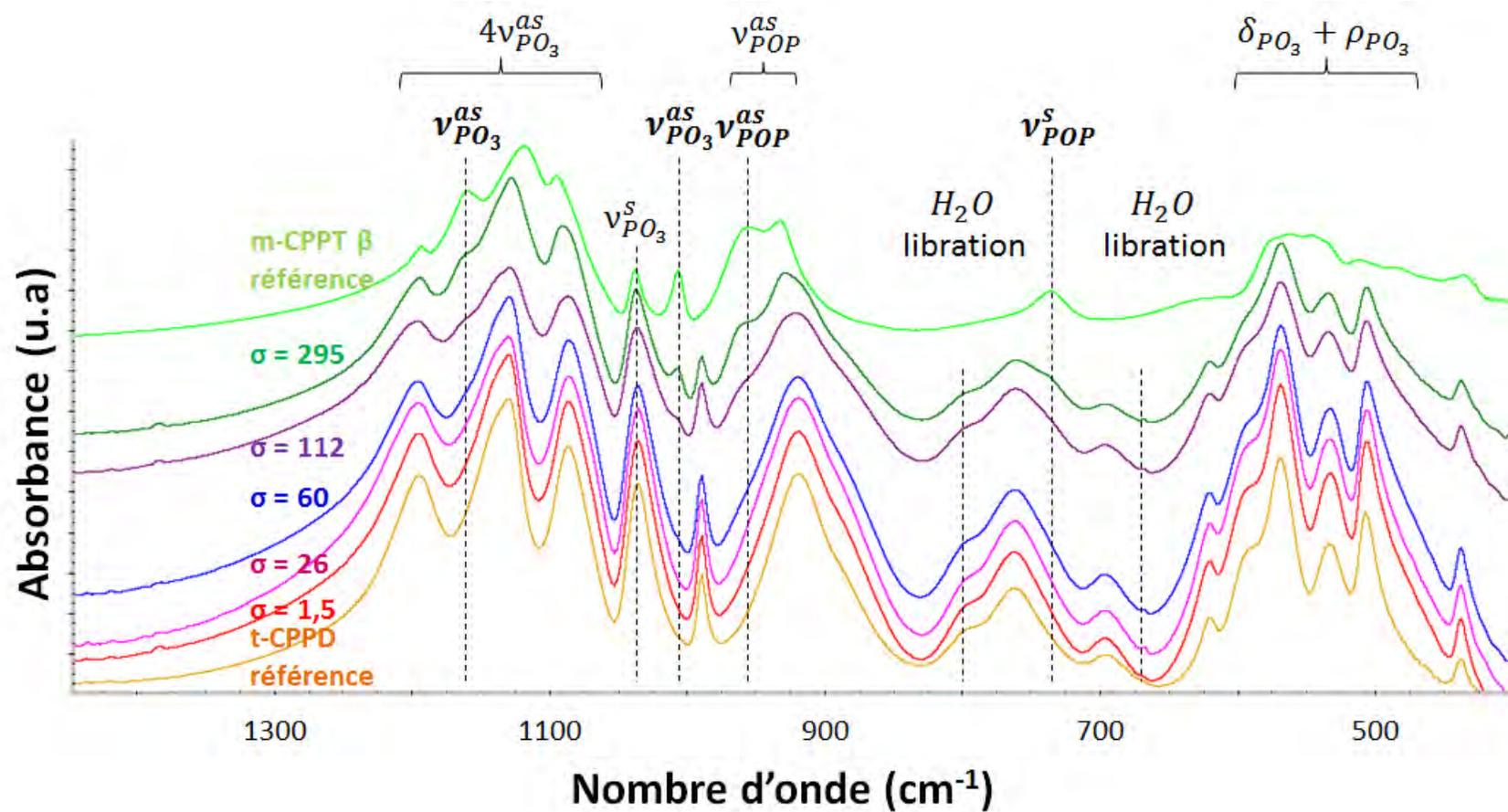


Figure III-6- Spectres d'absorption infrarouge des semences après expérience de C4 pour diverses sursaturations relatives.

Tableau III-4-Temps d'induction τ (min) et vitesse initiale de croissance cristalline R_c ($\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) en fonction de la sursaturation relative dans la solution de travail et type de phase de CPP formée ($V_{\text{total}} = 100 \text{ mL}$, $T = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,22$, $m_{\text{t-CPPD}} = 10 \text{ mg}$, $[\text{Ca}] = [\text{P}]$).

[Ca] (M)	$\sigma_{\text{t-CPPD}}$	τ (min)	R_c ($\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	Phase de CPP formée (identification par FTIR)
$1,12\cdot 10^{-4}$	1,5	340 ± 52	$(7,1 \pm 1,6)\cdot 10^{-8}$	t-CPPD
$1,23\cdot 10^{-4}$	2	-	$(8,6 \pm 1,9)\cdot 10^{-8}$	t-CPPD
$1,42\cdot 10^{-4}$	3	121 ± 9	$(1,4 \pm 0,3)\cdot 10^{-7}$	t-CPPD
$1,50\cdot 10^{-4}$	3,5	8 ± 1	$(5,7 \pm 2,0)\cdot 10^{-7}$	t-CPPD
$1,70\cdot 10^{-4}$	5	~ 1	$(2,0 \pm 0,8)\cdot 10^{-6}$	t-CPPD
$2,30\cdot 10^{-4}$	12	~ 1	$(2,7 \pm 0,8)\cdot 10^{-6}$	t-CPPD
$3,00\cdot 10^{-4}$	26	~ 1	$(5,9 \pm 0,9)\cdot 10^{-6}$	t-CPPD
$4,00\cdot 10^{-4}$	60	~ 1	$(7,6 \pm 1,0)\cdot 10^{-6}$	t-CPPD
$5,00\cdot 10^{-4}$	112	-	$(1,1 \pm 0,1)\cdot 10^{-5}$	m-CPPT β
$7,00\cdot 10^{-4}$	295	$\sim 0,5$	$(1,7 \pm 0,2)\cdot 10^{-5}$	m-CPPT β

III-3-2-1 Influence de la sursaturation relative sur le temps d'induction

La Figure III-7 illustre la variation du temps d'induction τ ou temps de latence en fonction de la sursaturation relative de la solution de travail. On note la présence d'un temps d'induction pour de faibles sursaturations relatives ($1,5 < \sigma < 3$). Or il s'agit de croissance cristalline homogène de t-CCPD sur une semence de t-CPPD pour laquelle aucun temps d'induction ne devrait normalement être observé. Il apparait que τ diminue lorsque la sursaturation augmente. La variation de la valeur de τ est particulièrement grande pour de faibles sursaturations et au fur et à mesure que celle-ci augmente le temps d'induction diminue plus lentement. Ce type d'évolution est compatible avec la diminution du rayon critique du germe r_c lorsque la sursaturation croît selon l'équation suivante (Mullin, 2001) :

$$r_c = \frac{2v\gamma}{RT \text{Ln}\sigma} \quad (\text{III-3})$$

avec v le volume de l'unité de croissance, γ l'énergie interfaciale, σ le rapport de sursaturation (ou rapport du produit ionique sur produit de solubilité), T la température absolue ($T = 310 \text{ K}$) et R la constante des gaz parfaits ($R = 8,31 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Etant donné que nous avons travaillé à force ionique et pH constants, l'énergie interfaciale γ est constante. Cela signifie que la valeur moyenne du rayon critique des germes r_c dépend uniquement de la sursaturation du milieu.

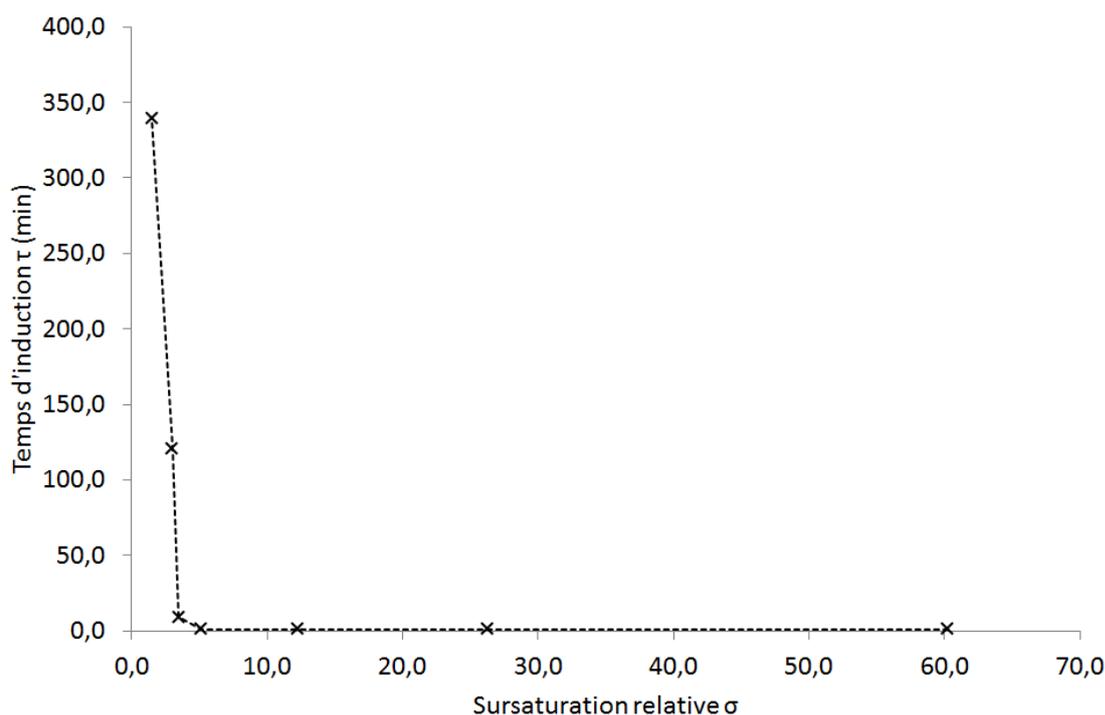


Figure III-7-Variation du temps d'induction en fonction de la sursaturation relative de la solution de travail.

III-3-2-2 Influence de la sursaturation relative sur la vitesse initiale de croissance

La Figure III-8 représente la variation de la vitesse initiale de croissance cristalline R_c de la phase t-CPPD pour différentes gammes de sursaturation relative σ . La valeur de R_c augmente fortement avec la sursaturation relative. Deux phénomènes, ayant lieu lorsque la sursaturation de la solution augmente, peuvent expliquer une telle variation :

- une augmentation du nombre de germes à la surface du t-CPPD
- l'accroissement de la vitesse de croissance de ces germes

Les mécanismes de croissance cristalline contrôlés par des phénomènes de surface se classent principalement en deux catégories : la germination de surface (Nielsen, 1984), (Hillig, 1966) (Nancollas and Purdie, 1964) et la croissance en spirale. Dans chacun de ces deux cas, la diffusion en volume intervient de façon limitée et la vitesse de croissance globale correspond alors à une combinaison des processus conduisant à la diffusion en surface et aux réactions de surface. Les réactions contrôlées par des phénomènes de surface peuvent en

général s'exprimer selon l'expression de la vitesse de croissance suivante (équation (III-4)) proposée par Mullin (Mullin, 2001).

$$Rc = K_s \times \sigma^n \quad (III-4)$$

Avec K_s la constante de vitesse qui est proportionnelle au nombre de sites de croissance à la surface du substrat et dépend de la température via une loi de type Arrhenius, n l'ordre global de la réaction qui dépend du mécanisme prépondérant de la croissance. La valeur de n varie essentiellement entre 1 et 4. Lorsque $n = 1$, c'est la diffusion dans la solution qui impose la vitesse, lorsque $n = 2$, il s'agit d'un mécanisme de croissance en spirale et enfin lorsque n est supérieur à 2, le phénomène de polynucléation à la surface du cristal prévaut (Nielsen, 1984). Il existe aussi le cas où $n > 1$ qui correspond à une variante du mécanisme d'ordre 1 contrôlé par la diffusion pour lequel on observe une déviation de la valeur de n (Schierholtz, 1958) due à une concentration en ions dans le soluté non uniforme (Humphreys-Owen, 1949), (Amelinckx, 1950) à la surface des faces des cristaux qui croissent. Il s'agit d'un mécanisme de croissance majoritairement contrôlé par la surface plus que par la diffusion en solution (O'rourke and Johnson, 1955).

Il est donc possible de déterminer l'ordre apparent de la réaction n et la constante de vitesse K_s en considérant la loi cinétique de l'équation (III-4). Les représentations de la vitesse de croissance Rc en fonction de la sursaturation relative σ pour différentes gammes de σ (respectivement $1,5 < \sigma < 3$ et $3 < \sigma < 60$) sont sur les Figure III-9 et Figure III-10, respectivement. Les constantes n et K_s correspondent respectivement à la pente de la droite et au coefficient exponentiel de l'ordonnée à l'origine. Leurs valeurs, déterminées pour différentes gammes de sursaturations relatives ainsi que l'expression des Rc sont reportées dans le Tableau III-5. La représentation de la vitesse de croissance Rc en fonction de la sursaturation relative σ pour une gamme de faibles sursaturations ($1,5 < \sigma < 3$; Figure III-9 et Tableau III-5) montre une variation linéaire ($R^2 = 0,991$). L'ordre apparent n de cette loi de croissance est supérieur à 1 ($n = 1,39$; Tableau III-5) pourrait signifier que dans ce cas la croissance est majoritairement contrôlée par la concentration en soluté à la surface des cristaux. Cette hypothèse est en adéquation avec les résultats des rares études existantes à ce jour sur la croissance et la dissolution du t-CPPD réalisées par Christoffersen *et al.* Les auteurs ont constaté (Christoffersen *et al.*, 1999) que le processus de dissolution du t-CPPD n'est pas uniquement limité par un mécanisme de surface polynucléaire, mais est également influencé par le transport de substances loin de la surface du cristal. Dans leur étude sur la

croissance du t-CPPD ; Christoffersen *et al.* (Christoffersen et al., 2001) font le parallèle avec leur précédente étude (Christoffersen et al., 1999) et décrivent le mécanisme de croissance du t-CPPD comme étant purement contrôlé par des phénomènes de surface. Ce type de mécanisme pourrait aussi expliquer pourquoi à de faibles sursaturations relatives ($1,5 < \sigma < 3$) correspondant à de faibles concentrations en ions Ca et P, un temps d'induction est observé avant le début de la croissance de t-CPPD en présence d'une semence de t-CPPD. A faible sursaturation relative σ , le temps d'induction τ pourrait être proportionnel à la concentration et à la vitesse de diffusion des ions plus ou moins proches de la surface de cristaux. Enfin, si la croissance est majoritairement contrôlée par la concentration en soluté à la surface des cristaux, cela implique que cette croissance dépende grandement de la sursaturation c'est pourquoi pour vérifier ce résultat les paramètres n et K_s ont aussi été déterminés à partir d'une représentation logarithmique de R_c en fonction de σ pour des σ compris entre 1,5 et 60 (nous avons noté la disparition du temps d'induction pour des $\sigma > 3$). Un temps d'induction de plusieurs heures est observé pour de faibles sursaturations relatives alors que l'on se trouve dans un cas de nucléation homogène de t-CPPD sur semences de t-CPPD pour lequel il ne devrait à priori pas avoir lieu d'être. Le nouvel ordre de réaction déterminé $n=1,39$ est inchangé par rapport au précédent et confirme que le mécanisme de croissance observé est un mécanisme de diffusion mais majoritairement contrôlé par la surface. Le coefficient de corrélation de la représentation de $\ln(R_c) = f(\ln \sigma)$ avec $R^2 = 0,855$ semble acceptable compte tenu du fait que cette loi est déterminée à partir de valeurs expérimentales de R_c sur une très large gamme de σ allant jusqu'à des valeurs de sursaturations relatives très élevées ($\sigma = 60$). En effet, expérimentalement des variations de 30% d'écart sur les valeurs de R_c obtenues pour la répétition d'un essai de C4 sont de l'ordre de grandeur classique et acceptable d'une erreur.

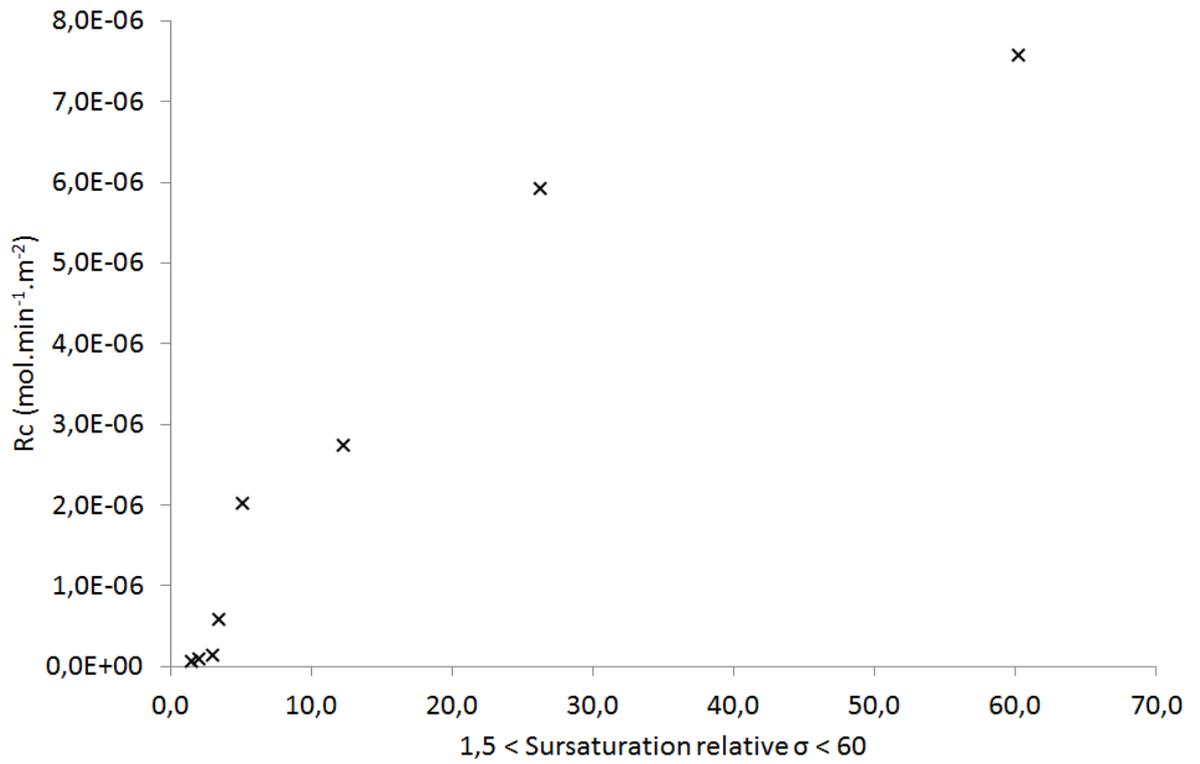


Figure III-8 -Variation de la vitesse de croissance R_c de la phase t -CPPD en présence d'une semence de t -CPPD en fonction de la sursaturation relative σ comprise entre 1,5 et 60.

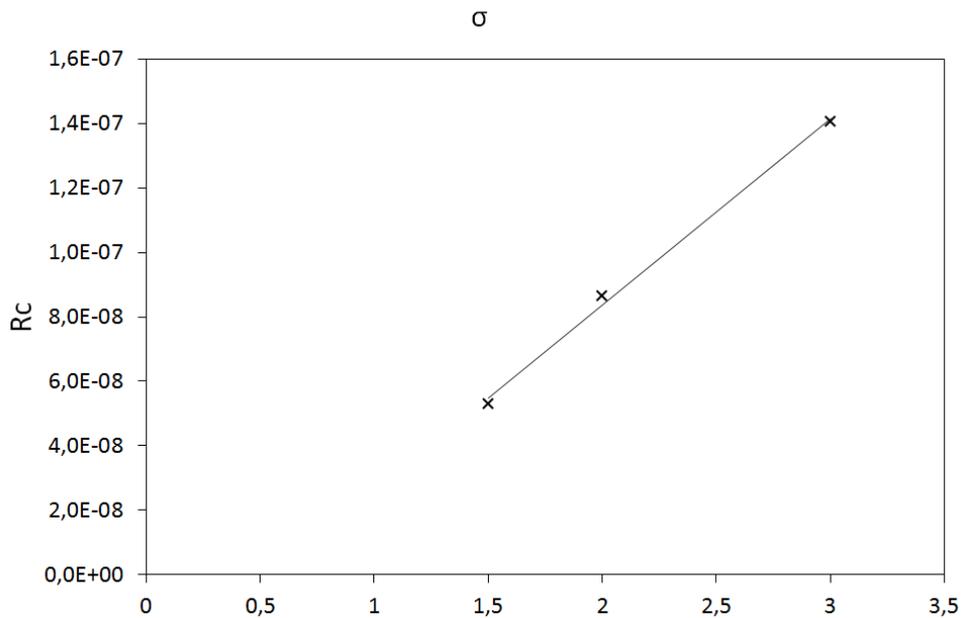


Figure III-9- Représentation de la vitesse de croissance cristalline en fonction de la sursaturation relative $\sigma_{t\text{-CPPD}}$ de la solution, pour des sursaturations relatives comprises entre 1,5 et 3.

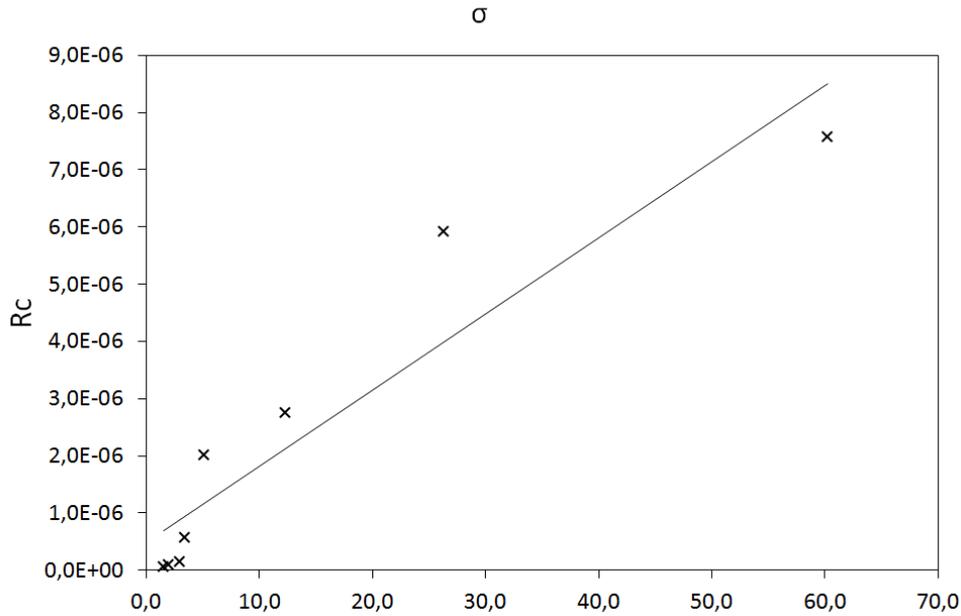


Figure III-10- Représentation de la vitesse de croissance en fonction de la sursaturation relative σ_t CPPD de la solution, pour des sursaturations relatives comprises entre 1,5 et 60.

Tableau III-5- Expressions de la vitesse de croissance cristalline du type $Rc = Ks \cdot \sigma^n$ déterminées à partir des droites $\ln Rc = f(\ln \sigma)$, pour chaque gamme de σ considérée.

Gamme de σ considérée	Rc (mol.min ⁻¹ .m ⁻²)	Coefficient de corrélation
$1,5 \leq \sigma \leq 3$	$Rc = 3,11 \cdot 10^{-8} \times \sigma^{1,39}$	0,991
$1,5 \leq \sigma \leq 60$	$Rc = 5,54 \cdot 10^{-8} \times \sigma^{1,39}$	0,855

III-3-3 Etude de la cristallisation de la phase m-CPPD et m-CPPT β à partir d'une semence respectivement de la même phase

III-3-3-1 Cas de la cristallisation du m-CPPD à la surface d'une semence de m-CPPD

L'évolution du pH et du volume d'ajout de solutions titrantes en fonction du temps des essais de C4 réalisés avec une sursaturation $\sigma = 2,2$ vis-à-vis de la phase m-CPPD ($\sigma = 12$ vis-à-vis de la phase t-CPPD) en présence d'une semence de m-CPPD est présentée sur la Figure III-11. Le relevé de pH représenté sur cette figure est maintenu constant et égal à $6,22 \pm 0,01$ grâce à l'ajout de solutions titrantes. Aucun temps d'induction significatif n'est observé. Comme attendu, la première partie de la courbe d'ajout des solutions titrantes à l'allure d'une droite. En revanche, la seconde partie de cette courbe à non pas une allure exponentielle

généralement caractéristique de phénomènes de nucléation secondaire mais une allure logarithmique assez inhabituelle pour une courbe de C4. Nous n'avons pas d'explication pour cette observation.

Les spectres d'absorption infrarouge de la phase m-CPPD de référence (semence) et des produits récupérés à la suite de ces essais de C4 sont présentés sur la Figure III-12. Les bandes de vibration observées sur chacun de ces deux spectres se trouvent strictement aux mêmes longueurs d'onde, ce qui confirme qu'après C4 la phase qui a cru lors des essais est bien du m-CPPD. Le temps d'induction observé peut être considéré comme inexistant car il est inférieur à 30 secondes ; la vitesse de croissance R_c du m-CPPD est égale à $(2,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$ mol.min⁻¹.m⁻².

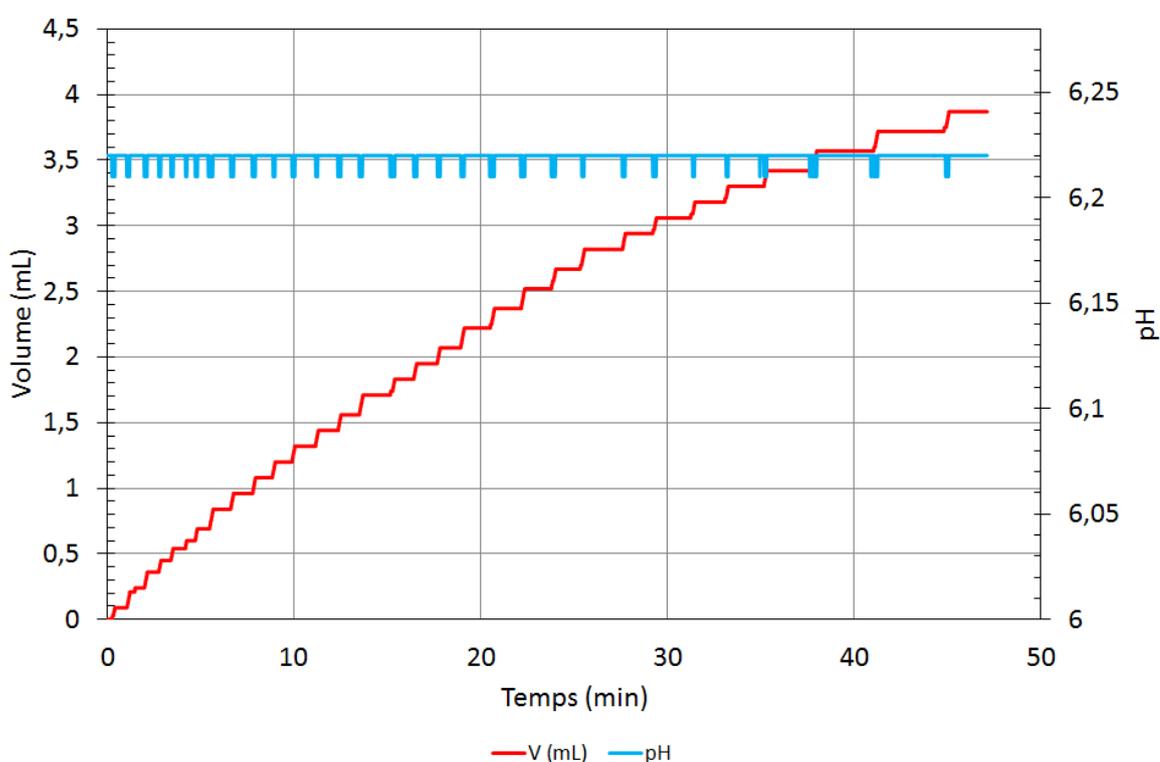


Figure III-11 Courbes d'évolution du pH (bleu) et du volume de solutions titrantes ajoutées (rouge) en présence d'une semence de m-CPPD pour une sursaturation $\sigma = 2,2$ vis-à-vis de la phase m-CPPD ($\sigma = 12$ vis-à-vis de la phase t-CPPD). ($V_{total} = 100$ mL, $T = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,22$, $m_{m\text{-CPPD}} = 10$ mg, $[\text{Ca}] = [\text{P}] = 2,30 \cdot 10^{-4} \text{M}$).

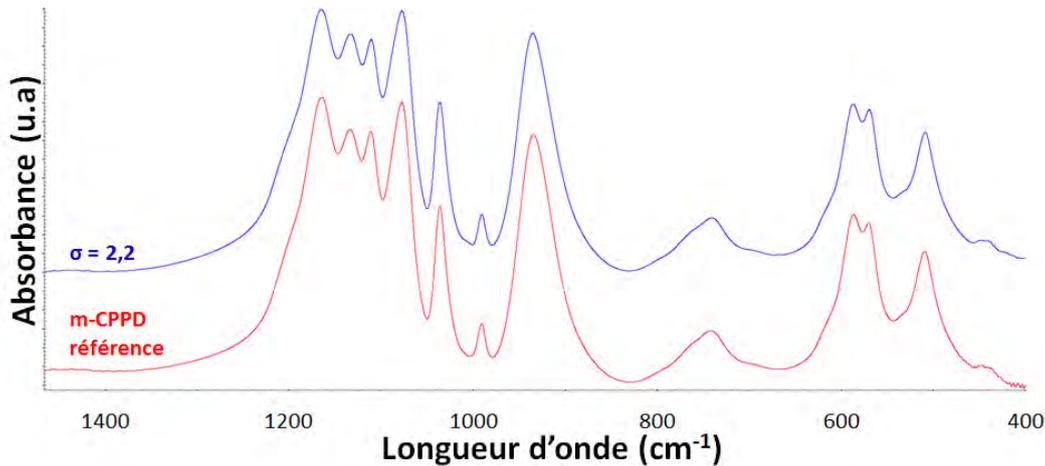


Figure III-12- Spectres d'absorption infrarouge de la phase m-CPPD de référence (semence) et de produits récupérés suite aux essais de C4 réalisés à une sursaturation relative $\sigma = 2,2$ vis-à-vis de la phase m-CPPD (soit $\sigma = 12$ vis-à-vis de la phase t-CPPD) en présence d'une semence de m-CPPD. ($V_{total} = 100 \text{ mL}$, $T = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,22$, $m_{m\text{-CPPD}} = 10 \text{ mg}$, $[\text{Ca}] = [\text{P}] = 2,30 \cdot 10^{-4} \text{ M}$).

III-3-3-2 Cas de la cristallisation du m-CPPT β à la surface d'une semence de m-CPPT β

De la même manière les R_c et τ pour la croissance de m-CPPT β sur une semence de m-CPPT β ont été déterminés. La Figure III-13 présente l'évolution du pH et du volume d'ajout de solutions titrantes en fonction du temps des essais de C4 réalisés avec une sursaturation relative $\sigma = 2,2$ vis-à-vis de la phase m-CPPT β (soit $\sigma = 7$ vis-à-vis de la phase m-CPPD et $\sigma = 39$ vis-à-vis de la phase t-CPPD). Le relevé de pH représenté sur cette figure est maintenu constant ($\pm 0,01$ unité pH) grâce à l'ajout d'une solution titrante. Aucun temps d'induction significatif n'est observé et l'allure de la courbe d'ajout de titrant obtenue est caractéristique d'une courbe de C4 ; la première partie de la courbe a l'allure d'une droite et la seconde partie a une allure exponentielle généralement caractéristique de phénomènes de nucléation secondaire. L'analyse par spectroscopie IR du produit récupéré suite à ces essais présentée sur la figure Figure III-14 indique que nous sommes en présence de croissance homogène de m-CPPT β sur une semence de m-CPPT β . Comme pour la phase m-CPPD, le temps d'induction observé peut être considéré comme inexistant car il est inférieur à 30 secondes. Le R_c de la phase m-CPPT β est égal à $(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$.

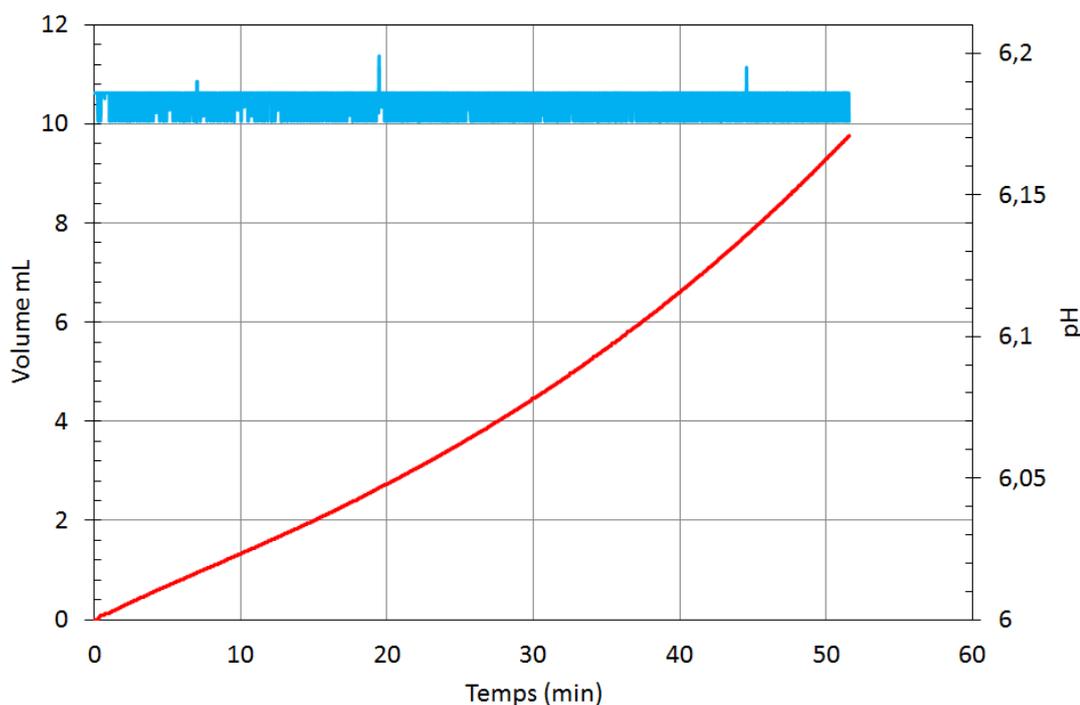


Figure III-13 - Courbes d'évolution du pH (bleu) et du volume de solutions titrantes ajoutées (rouge) en présence d'une semence de *m*-CPPT β pour une sursaturation $\sigma = 2,2$ vis-à-vis de la phase *m*-CPPT β ($\sigma = 7$ vis-à-vis de la phase *m*-CPPD et $\sigma = 39$ vis-à-vis de la phase *t*-CPPD). ($V_{total} = 100$ mL, $T = 37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,22$, $m_{m\text{-CPPT}\beta} = 10$ mg, $[\text{Ca}] = [\text{P}] = 3,50 \cdot 10^{-4} \text{M}$).

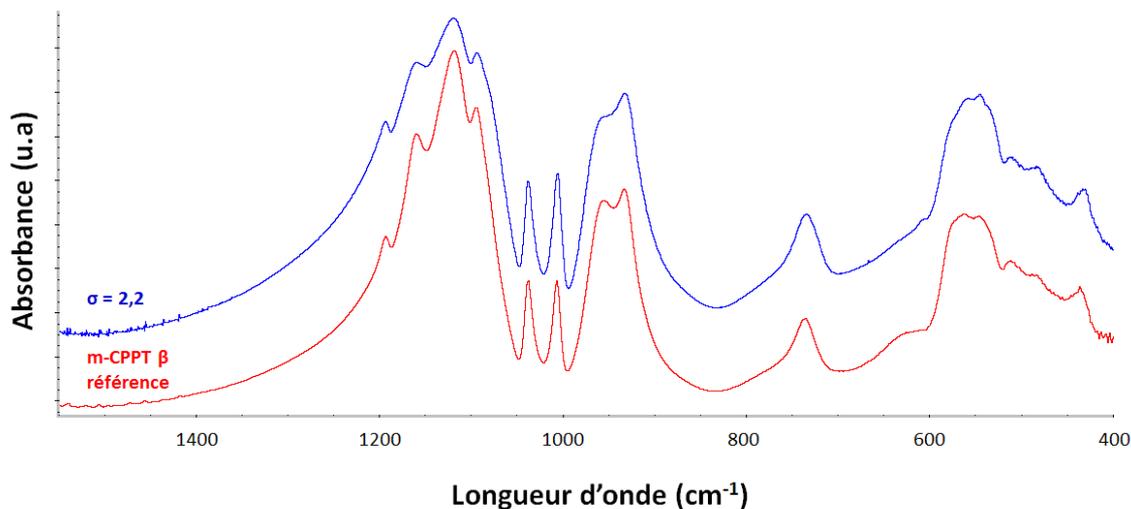


Figure III-14- Spectres d'absorption infrarouge de la phase *m*-CPPT β de référence (semence) et du produits récupérés suite aux essais de C4 réalisés à une sursaturation relative $\sigma = 2,2$ vis-à-vis de la phase *m*-CPPT β ($\sigma = 7$ vis-à-vis de la phase *m*-CPPD et $\sigma = 39$ vis-à-vis de la phase *t*-CPPD) en présence d'une semence de *m*-CPPT β . ($V_{total} = 100$ mL, $T = 37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,22$, $m_{m\text{-CPPT}\beta} = 10$ mg, $[\text{Ca}] = [\text{P}] = 3,50 \cdot 10^{-4} \text{M}$).

III-3-3-3 Comparaison des résultats obtenus pour les différentes phases de CPP hydraté

Sachant que pour $\sigma_{t\text{-CPPD}} = 2$ la vitesse de croissance cristalline de la phase t-CPPD est d'environ $8,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ (Tableau III-4), les vitesses initiales de croissance cristalline déterminées à $\sigma = 2$ (σ constant pour chaque phase de CPP) suivent l'ordre décroissant suivant : $R_c(\text{m-CPPT } \beta) > R_c(\text{m-CPPD}) > R_c(\text{t-CPPD})$. D'autre part, $pK_s(\text{m-CPPT } \beta) < pK_s(\text{m-CPPD}) < pK_s(\text{t-CPPD})$ (Tableau III-1) ce qui signifie que les phases les plus solubles ont des R_c plus élevés.

III-3-4 Effet d'additifs ioniques sur la cristallisation de la phase t-CPPD

Suite aux essais préliminaires relatifs à l'étude de la cristallisation de t-CPPD sur une semence de t-CPPD (cf. III-3-2), nous avons fait le choix de travailler à $\sigma = 3,5$ pour les essais à réaliser en présence d'additifs ioniques afin d'identifier l'influence du Cu^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} sur les paramètres cinétiques de germination et croissance cristalline de la phase t-CPPD. Pour cette étude des essais de C4 ont été réalisés pour une σ donnée avec le même protocole que celui utilisé précédemment à cela près qu'une certaine quantité d'additif ionique a été ajoutée à la solution de travail avant le début de l'expérience. Les contre ions apportés par la solution d'additif ajoutée à la solution de travail ont été pris en compte pour atteindre une force ionique de 0,1 M in fine dans la solution de travail. Le choix de la sursaturation relative s'est porté sur la valeur $\sigma = 3,5$ car cela correspond à la sursaturation à partir de laquelle le temps d'induction observé pour de faibles σ n'est plus présent et pour laquelle la vitesse R_c correspond donc principalement à un phénomène de croissance.

Tous les produits obtenus suite aux essais de C4 ont été analysés par spectroscopie FTIR (spectres présentés sur la Figure III-15) comme présentés au paragraphe précédent (Figure III-6). Les résultats de ces analyses sont reportés dans le Tableau III-6 qui répertorie aussi les temps d'induction ainsi que les vitesses initiales de croissance cristalline déterminés lors de cette campagne d'essais.

D'après les analyses par spectroscopie FTIR (Figure III-15) on constate que seule la phase t-CPPD s'est formée lors des essais de C4 pour lesquels la cristallisation eu lieu en présence de $4,00 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ou 0,01 et 0,05 mM de Cu^{2+} , 0,10, 0,50, et 1,00 mM de Mg^{2+} ou 0,10mM de Zn^{2+} et qu'en présence de fortes concentrations en Zn^{2+} (0,50 et 1,00mM) c'est la phase m-CPPT β qui a poussé. La valeur $4,00 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ de Cu^{2+} a été choisie car elle correspond

à la concentration en Cu^{2+} permettant d'avoir dans la solution de travail un rapport Cu/Ca égal à celui observé lors des synthèses en réacteur réalisées en présence de 1 mM de Cu^{2+} (cf. chapitre II). Nous avons au départ choisi de tester cette concentration pour chaque additif ionique dans le but de comparer les deux études. Mais force est de constater qu'une aussi faible quantité n'a que peu ou pas d'effet sur la précipitation de t-CPPD ; cette concentration n'a finalement été testée que pour le cas du Cu^{2+} .

Notons par ailleurs que tous les essais de C4 ne comportant pas d'additif ionique dans le milieu ont été réalisés dans un réacteur double enveloppe agité à l'aide d'un barreau aimanté. Or il a été démontré que la cinétique de croissance du t-CPPD est principalement contrôlée par la surface mais aussi par de la diffusion ce qui fait que le « mélange/agitation » est un paramètre important à parfaitement contrôler pour s'affranchir de son influence sur les résultats obtenus. C'est pourquoi les essais réalisés en présence de Cu^{2+} et Mg^{2+} ont eu lieu dans un réacteur double enveloppe classique de précipitation comportant des contres pales et parfaitement agité à l'aide d'un arbre d'agitation mécanique identique à celui qui a été mis en œuvre pour l'étude reportée dans le Chapitre II. Suite à ce changement de montage l'essai de référence pour $\sigma = 3,5$ a été reproduit afin de vérifier si les résultats obtenus (τ , R_c , allure des courbes) restaient inchangés avant de réaliser les essais de C4 en présence d'additifs. L'ordre de grandeur de la vitesse initiale de croissance, du temps d'induction ainsi que l'allure des courbes obtenues avec chacun des réacteurs utilisés sont similaires.

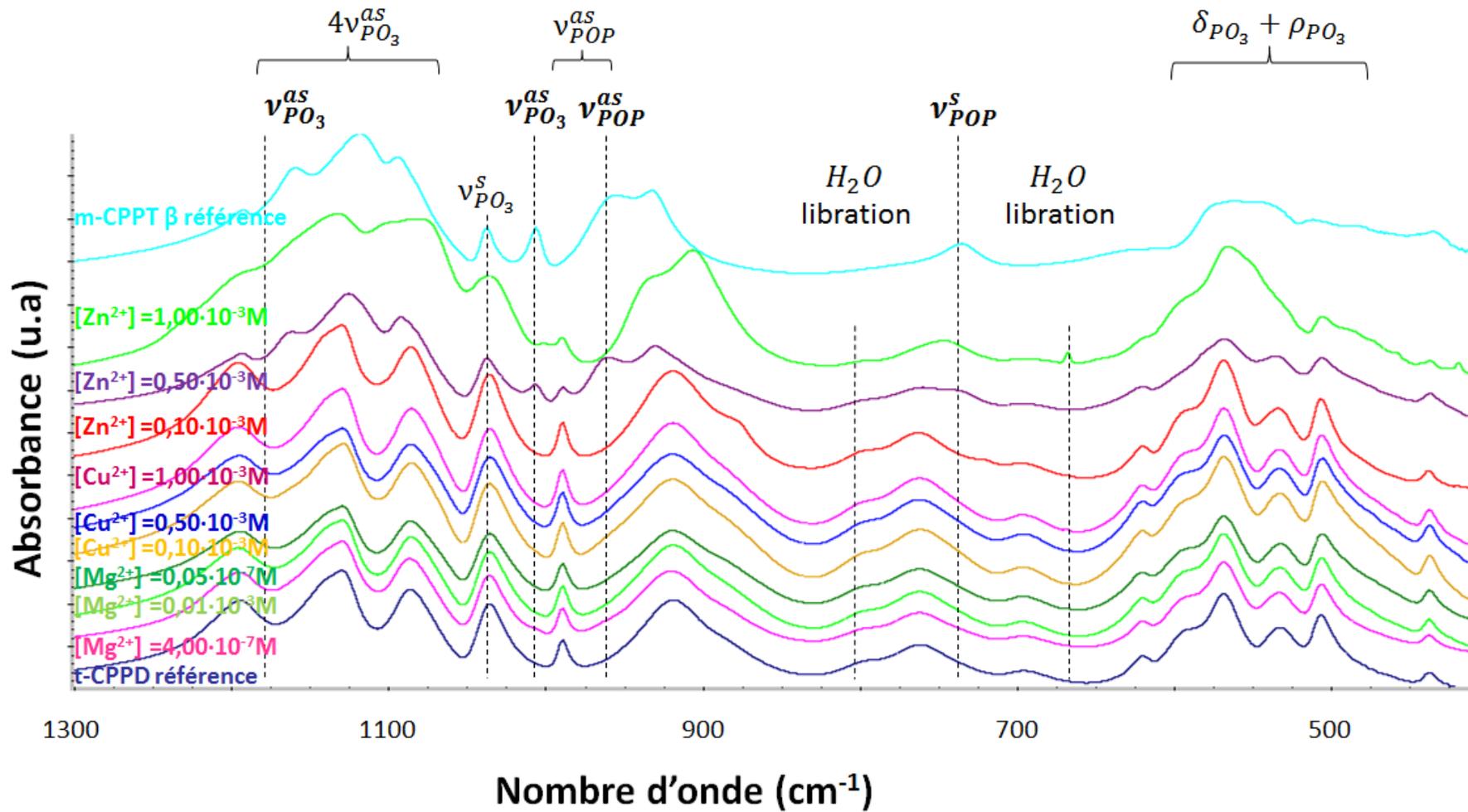


Figure III-15 Spectres d'absorption infrarouge des semences après expérience de C4 pour $\sigma = 3,5$ et réalisées en présence de $4,00 \cdot 10^{-7} M$, $0,01$ ou $0,05$ mM de Cu^{2+} , $0,10$, $0,50$, ou $1,00$ -mM de Mg^{2+} et $0,10$, $0,50$ ou $1,00$ -mM Zn^{2+} .

Tableau III-6 Temps d'induction τ (min) et vitesse initiale de croissance cristalline R_c ($\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) de t-CPPD sur semence de t-CPPD à une sursaturation relative $\sigma = 3,5$ en présence de différentes concentrations d'additifs ioniques (Cu^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+}) dans la solution de travail ($V_{\text{total}} = 100 \text{ mL}$, $T = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,22$, $m_{\text{t-CPPD}} = 10 \text{ mg}$, $[\text{Ca}] = [\text{P}]$). Les valeurs de R_c calculées ont été déterminées à l'aide de la formule de R_c donnée en fonction de σ dans le Tableau III-5.

Concentration en additif (M)	Cu^{2+}		Mg^{2+}		Zn^{2+}		CPP formé (identification par spectroscopie FTIR)			
	R_c ($\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	τ (min)	R_c ($\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	τ (min)	R_c ($\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	τ (min)	Référence	Cu^{2+}	Mg^{2+}	Zn^{2+}
Référence (sans additif)	$(5,7 \pm 2,0) \cdot 10^{-7}$ (<i>expérimentale</i>) $3,1 \cdot 10^{-7}$ (<i>calculé</i>)	~ 8	$(5,7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$ (<i>expérimental</i>) $3,1 \cdot 10^{-7}$ (<i>calculé</i>)	~ 8	$(5,7 \pm 2) \cdot 10^{-7}$ (<i>expérimental</i>) $3,1 \cdot 10^{-7}$ (<i>calculé</i>)	~ 8	t-CPPD			
$4,00 \cdot 10^{-7}$	$(5,7 \pm 0,06) \cdot 10^{-7}$	~ 9	-	-	-	-		t-CPPD		
$0,01 \cdot 10^{-3}$	$(4,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$	~ 4	-	-	-	-		t-CPPD		
$0,05 \cdot 10^{-3}$	$(2,2 \pm 1,0) \cdot 10^{-7}$	~ 8	-	-	-	-		t-CPPD		
$0,10 \cdot 10^{-3}$	-	> 600	$(6,1 \pm 0,6) \cdot 10^{-6}$	28	$(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$	~ 600		t-CPPD	t-CPPD	
$0,50 \cdot 10^{-3}$	-	-	0	> 1440	$2,4 \cdot 10^{-5}$	~ 60		-	m-CPPT	β
$1,00 \cdot 10^{-3}$	-	-	-	-	$2,6 \cdot 10^{-5}$	~ 60		-	m-CPPT	β

- **Cas du Cu^{2+}**

Les variations du temps d'induction et de la vitesse de croissance R_c pour des essais de C4 en présence d'ions Cu^{2+} dans la solution de travail à $\sigma = 3,5$ sont présentées sur les Figure III-16 et Figure III-17. On note une augmentation du temps d'induction et une diminution de la vitesse de croissance lorsque la concentration en Cu^{2+} dans le milieu augmente (Tableau III-6). Les R_c observés en présence de Cu^{2+} sont inférieurs à la valeur expérimentale de R_c à $\sigma = 3,5$ sans additif ($5,7 \pm 2,0$) $\cdot 10^{-7}$ mol.min⁻¹.m⁻²) et sensiblement inférieurs ou égaux à la valeur calculée de R_c ($3,1 \cdot 10^{-7}$ mol.min⁻¹.m⁻²) pour 0,05 mM Cu^{2+} . Rappelons que les valeurs de R_c calculées ont été déterminées à l'aide de la formule de R_c donnée en fonction de σ , formule qui dépend du mécanisme de croissance de la phase t-CPPD (Tableau III-5). La Figure III-18 représente les variations de pH et de volume de titrants ajouté pour une sursaturation $\sigma = 3,5$ en présence de 0,1 mM de Cu^{2+} . Une forte augmentation du pH est observée en présence de 0,1 mM de Cu^{2+} dans la solution de travail. De prime abord une telle augmentation pourrait être due à la carbonatation de la solution par captation du CO_2 ambiant. Pour vérifier cette hypothèse nous avons fait un essai de C4 en présence d'un bullage à l'azote afin de chasser un éventuel surplus de CO_2 . Malgré un bullage à l'azote une forte augmentation du pH est tout de même observée en présence de 0,1 mM de Cu^{2+} dans la solution de travail. (Figure III-18). On peut observer qu'à partir d'une concentration en Cu^{2+} de 0,1 mM, la croissance du t-CPPD est complètement inhibée (R_c n'a pas pu être mesuré et $\tau > 600$ min car l'essai a été stoppé après 10 heures d'attente). En conclusion, un effet dose dépendant de l'ion Cu^{2+} est observé sur la cinétique de précipitation du t-CPPD. La présence d'ion Cu^{2+} à faible concentration ($\leq 0,05$ mM) inhibe partiellement la croissance du t-CPPD et totalement à plus forte concentration ($\geq 0,1$ mM).

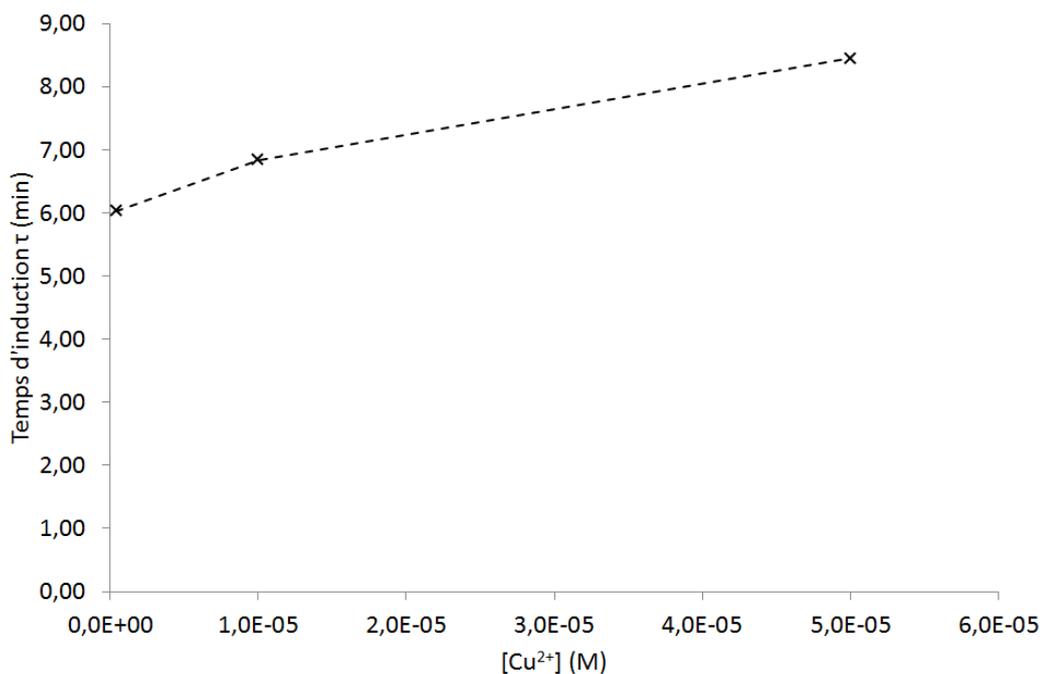


Figure III-16-Variation du temps d'induction en fonction de la concentration en Cu^{2+} ajoutée dans la solution de travail à $\sigma = 3,5$.

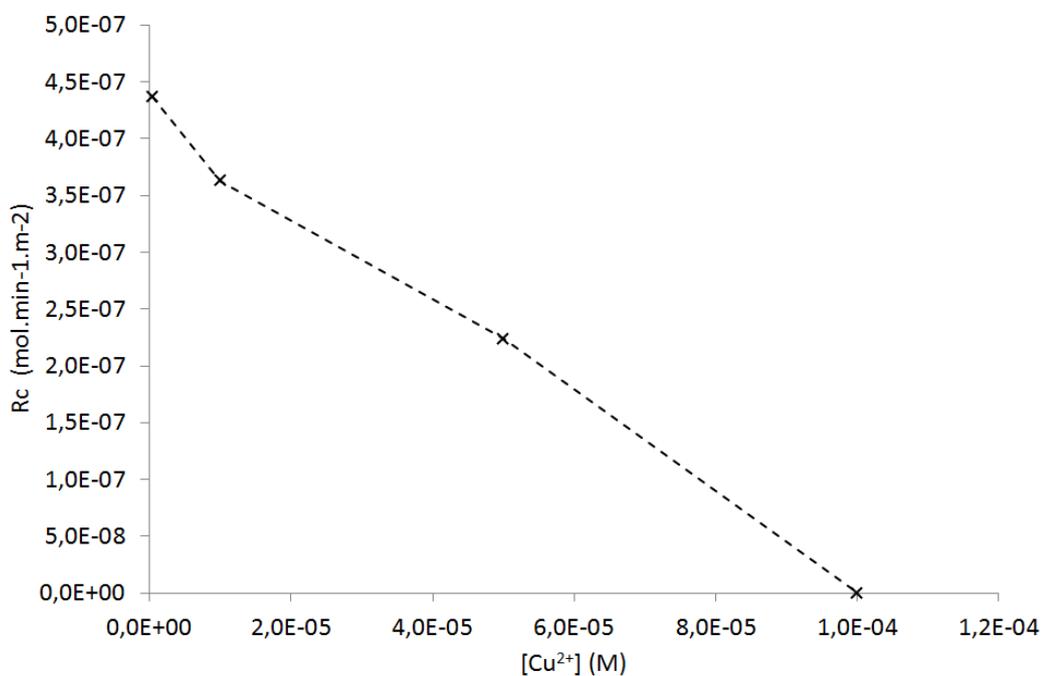


Figure III-17- Variation de la vitesse initiale de croissance cristalline du t-CPPD en fonction de la concentration en Cu^{2+} ajoutée dans la solution de travail à $\sigma = 3,5$.

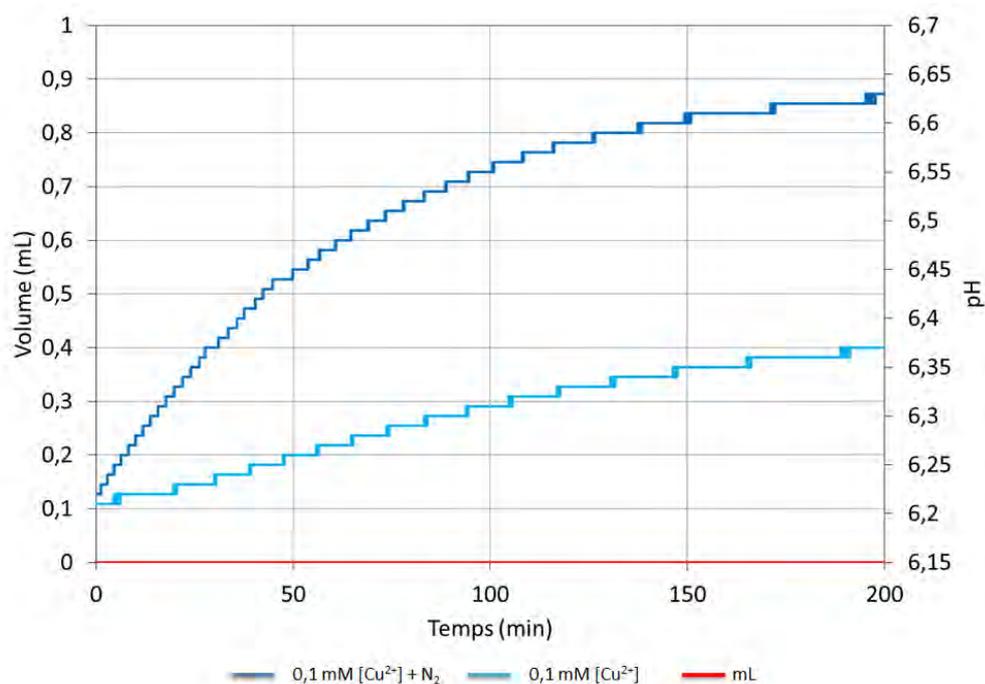


Figure III-18- Courbes d'évolution du pH (bleu) et du volume de titrant ajouté (rouge) pour une sursaturation $\sigma = 3,5$ en présence de $0,1 \text{ mM } [\text{Cu}^{2+}]$ et avec (bleu foncé) ou sans bullage (bleu clair) à l'azote N_2 dans la solution de travail.

- **Cas du Mg^{2+}**

L'évolution du pH et du volume d'ajout de solutions titrantes en fonction du temps des essais de C4 réalisés en présence de $0,1 \text{ mM } \text{Mg}^{2+}$ dans la solution de travail à $\sigma=3,5$ est présentée sur la Figure III-19 .Lors des essais en présence de $0,1 \text{ mM } \text{Mg}^{2+}$ la vitesse de croissance paraît avoir fortement augmentée : elle est égale à $(6,1 \pm 0.6) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ à comparer à $(5,7 \pm 2,0) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ (Rc expérimental sans additif) (Tableau III-6).

Toutefois compte tenu des incertitudes évaluées pour ces Rc, nous ne pouvons confirmer que cette différence est significative. On note aussi l'apparition d'un temps d'induction d'environ 28 min alors qu'il est négligeable en l'absence d'additif (~ 8 min). Après environ 50 min, le pH n'évolue plus et l'ajout de titrant cesse (Figure III-19) ce qui signifie que la croissance est alors inhibée. En présence d'une plus forte concentration en magnésium ($0,5 \text{ mM } \text{Mg}^{2+}$) le pH est resté constant durant plus de 24h et le volume d'ajout de solutions titrantes est resté nul (figure non présentée) ; ce qui nous amène à conclure que la croissance du t-CPPD a été inhibée. Et enfin, en présence de 1 mM de Mg^{2+} dans la solution de travail une augmentation du pH (figure non présentée) analogue au cas de $0,1 \text{ mM } \text{Cu}^{2+}$ (Figure III-18) a été observée. En conclusion, un effet dose dépendant de l'ion Mg^{2+} est

observé sur la cinétique de cristallisation du t-CPPD. La présence d'ion Mg^{2+} à faible concentration (0,1 mM) favorise la croissance du t-CPPD et l'inhibe à plus forte concentration (0,5 mM).

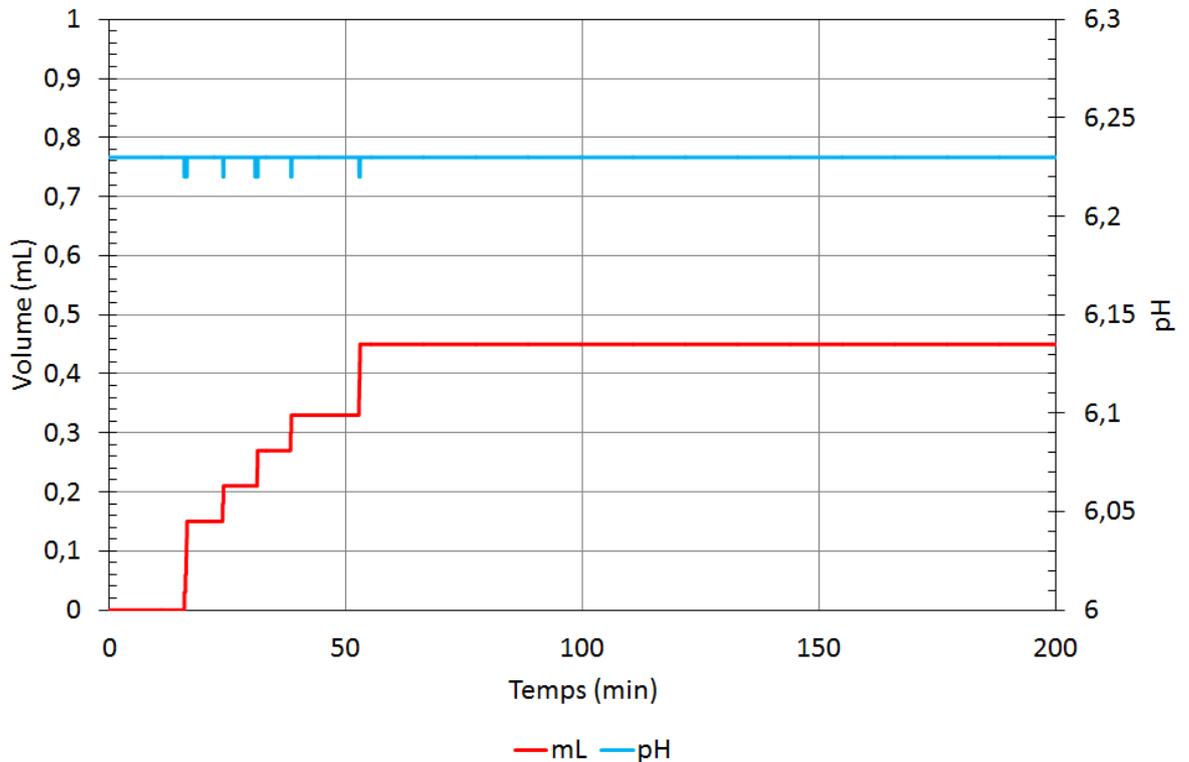


Figure III-19- Courbes d'évolution du pH (bleu) et du volume de solutions titrantes ajoutées (rouge) pour une sursaturation $\sigma = 3,5$ en présence de 0,1 mM $[Mg^{2+}]$.

- **Cas du Zn^{2+}**

L'évolution du pH et du volume d'ajout de solutions titrantes en fonction du temps des essais de C4 réalisés en présence de 0,1 et 0,5 mM de Zn^{2+} ajoutés dans la solution de travail à $\sigma = 3,5$ ($SI_{t-CPPD} = 0,54$; $SI_{m-CPPD} = -0,18$; $SI_{m-CPPD\beta} = -0,68$; Tableau III-2) est présentée sur les Figure III-20 et Figure III-21. Une augmentation du pH similaire au cas de 0,1 mM Cu^{2+} (Figure III-18) a été observée pour les essais réalisés en présence de 0,1 mM Zn^{2+} . Le temps d'induction est d'environ 10 heures et la vitesse de croissance cristalline ($2,1 \cdot 10^{-7}$ mol.min⁻¹. m⁻²) est inférieure à celle de la phase t-CPPD dans un milieu exempt d'additif ($5,7 \pm 2,0 \cdot 10^{-7}$ mol.min⁻¹. m⁻²) (Tableau III-6).

Une très faible augmentation du pH (+ 0,02) similaire au cas précédent a été observée pour les essais réalisés en présence de 0,5 mM de Zn^{2+} (Figure III-21) et 1 mM de Zn^{2+}

(figure non présentée ; similaire à la Figure III-21). Après près d'une heure la valeur du pH diminue continuellement et régulièrement sans parvenir à être compensée par l'ajout de solutions titrantes ce qui correspond probablement à la présence de précipitation spontanée. Un maintien du pH à 6,22 (pH consigne – 0,01 unité) est tout de même observé durant les 6 premières minutes d'ajout des titrants. Ceci indique que dans cet intervalle de temps, la solution est toujours sursaturée vis-à-vis de la phase t-CPPD uniquement ($\sigma = 3,5$ donc : $SI_{t-CPPD} = 0,54$; $SI_{m-CPPD} = -0,18$; $SI_{m-CPPT\beta} = -0,68$; Tableau III-2). Les vitesses de croissance élevées qui ont été déterminées (respectivement $2,4 \cdot 10^{-5}$ et $2,6 \cdot 10^{-5}$ mol.min⁻¹.m⁻² ; Tableau III-6) ont été calculées avec la pente dV/dt correspondant à une section de la courbe où le pH a bien été maintenu constant. Cela signifie donc que les vitesses calculées pourraient bien être celles du t-CPPD (seule phase vis-à-vis de laquelle la solution est sursaturée dans ces conditions). La non compensation du pH observée par la suite en conséquence de cette croissance très rapide implique que la sursaturation de la solution n'est plus contrôlée et permet la précipitation spontanée d'une autre phase de CPP (ici m-CPPT β ; Tableau III-6). Les vitesses de croissance Rc calculées dans les cas de 0,5 et 1 mM de Zn²⁺ présents dans le réacteur (respectivement $2,4 \cdot 10^{-5}$ et $2,6 \cdot 10^{-5}$ mol.min⁻¹.m⁻²) sont fortement supérieures au Rc du t-CPPD formé dans un milieu exempt d'additif ($5,7 \pm 2,0 \cdot 10^{-7}$ mol.min⁻¹.m⁻² (Rc expérimental)). En conclusion, un effet dose dépendant de l'ion Zn²⁺ est observé sur la cinétique de précipitation du t-CPPD. A faible concentration (0,1 mM) la présence d'ions Zn²⁺ inhibe la croissance cristalline de la phase t-CPPD et la favorise à forte concentration (0,5 et 1 mM).

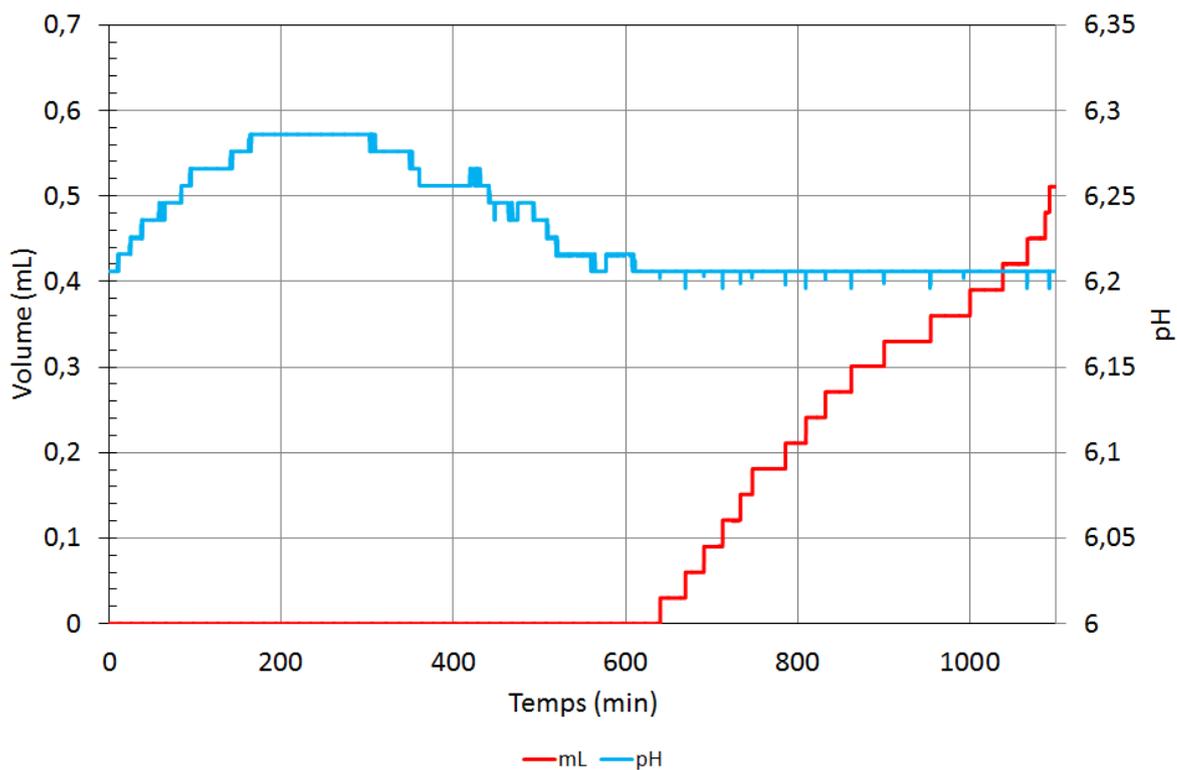


Figure III-20- Courbes d'évolution du pH (bleu) et du volume de solutions titrantes ajoutées (rouge) pour une sursaturation $\sigma = 3,5$ en présence de $0,1 \text{ mM Zn}^{2+}$.

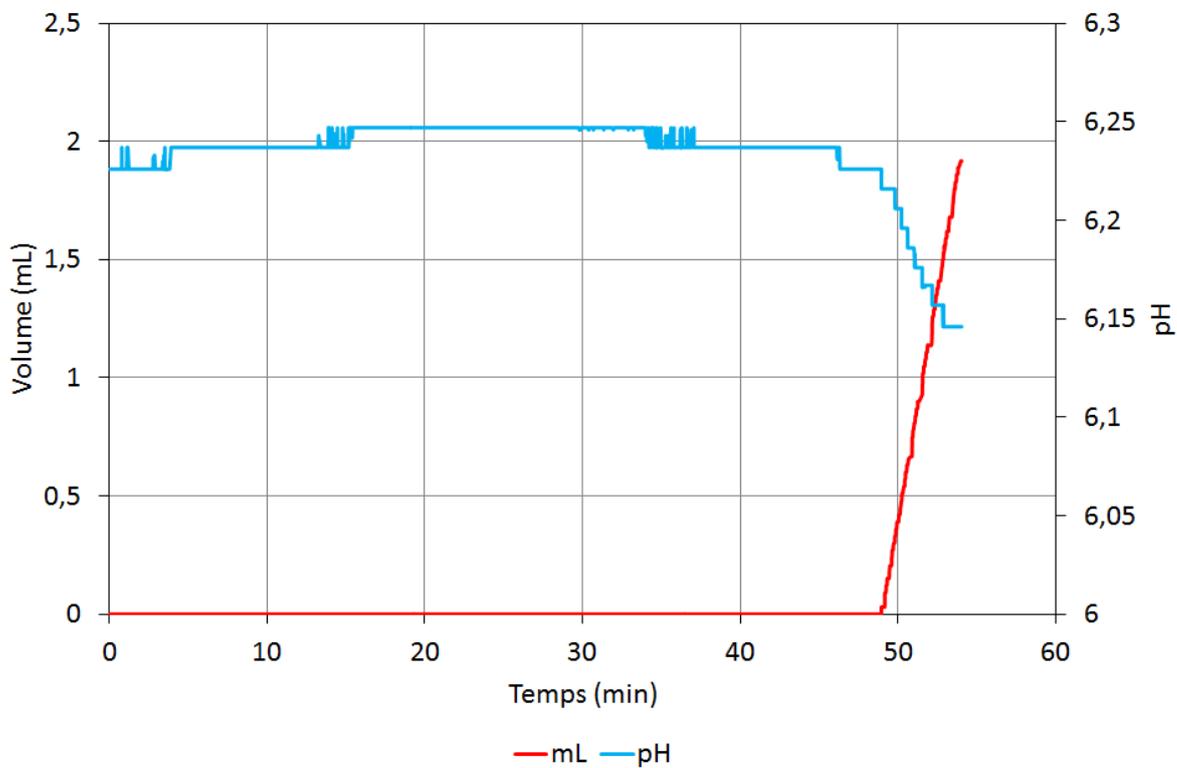


Figure III-21- Courbes d'évolution du pH (bleu) et du volume de solutions titrantes ajoutées (rouge) pour une sursaturation $\sigma = 3,5$ en présence de $0,5 \text{ mM Zn}^{2+}$.

III-3-5 Caractérisation par microscopie électronique à balayage du t-CPPD formé en présence ou non d'additifs ioniques

Les images de microscopie électronique à balayage de la semence de t-CPPD et des poudres obtenues suite aux essais de C4 à $\sigma = 3,5$ réalisés sans additifs ou en présence de 0,1 mM de Cu^{2+} , 0,1 et 1 mM de Mg^{2+} ou 0,1 mM de Zn^{2+} sont respectivement présentées sur les Figure III-22, Figure III-23, Figure III-24 et Figure III-25.

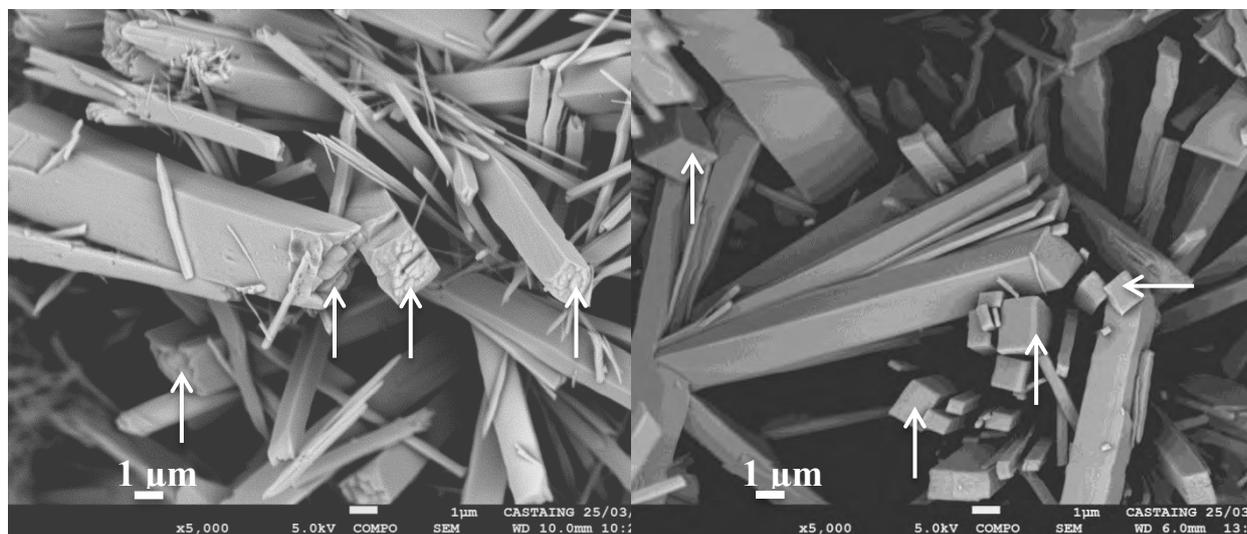
Les cristaux de t-CPPD obtenus après C4 sans additif présentent des signes de croissance cristalline à la surface de leurs extrémités (Figure III-22). Ces faces sont lisses ou paraissent recouvertes d'une fine couche de matière (indiquée par des flèches ; Figure III-22) en comparaison aux cristaux parallélépipédiques de la semence de t-CPPD utilisée présentant des extrémités cassées avec de nombreux sites potentiels de croissance (défauts de surface).

Les cristaux de t-CPPD obtenus après C4 en présence de 0,1 mM de Cu^{2+} présentent eux aussi des signes de croissance cristalline à la surface de leurs extrémités (Figure III-23). Ces faces paraissent recouvertes d'une fine couche de matière (indiqué par des flèches ; Figure III-23) plus importante que celle observée dans le cas des cristaux obtenus après C4 sans additif (Figure III-22). Cette observation confirme la présence de croissance à la surface de la semence de t-CPPD en présence de Cu^{2+} , caractérisée par une vitesse initiale de croissance cristalline plus faible qu'en l'absence de Cu^{2+} (Tableau III-6).

Les cristaux de t-CPPD obtenus après C4 en présence de 0,1 Mg^{2+} présentent des « fines couches bidimensionnelles de matière » à la surface indiquée par des flèches sur la Figure III-24. Ces « fines couches bidimensionnelles de matière » paraissent plus nombreuses et semblent plus importantes que celle observées dans le cas des cristaux obtenus après C4 sans additif ou en présence de Cu^{2+} (Figure III-22 et Figure III-23). Cela confirme la présence de croissance cristalline à la surface des cristaux de t-CPPD caractérisée par une vitesse initiale de croissance cristalline plus élevée qu'en l'absence de Mg^{2+} (Tableau III-6).

Les cristaux de t-CPPD obtenus après C4 en présence de 0,1 Zn^{2+} présente aussi la présence de nombreuses « fines couches bidimensionnelles de matière » à la surface des cristaux de t-CPPD indiqué par des flèches (Figure III-25 ; c et d). De plus, on peut remarquer que les cristaux de t-CPPD obtenus après C4 en présence de 0,1 Zn^{2+} sont plus petits, plus nombreux et plus dispersés que ceux de la semence de référence et des cristaux obtenus après C4 sans additif (Figure III-25 ; a et b). La présence de croissance à la surface de la semence

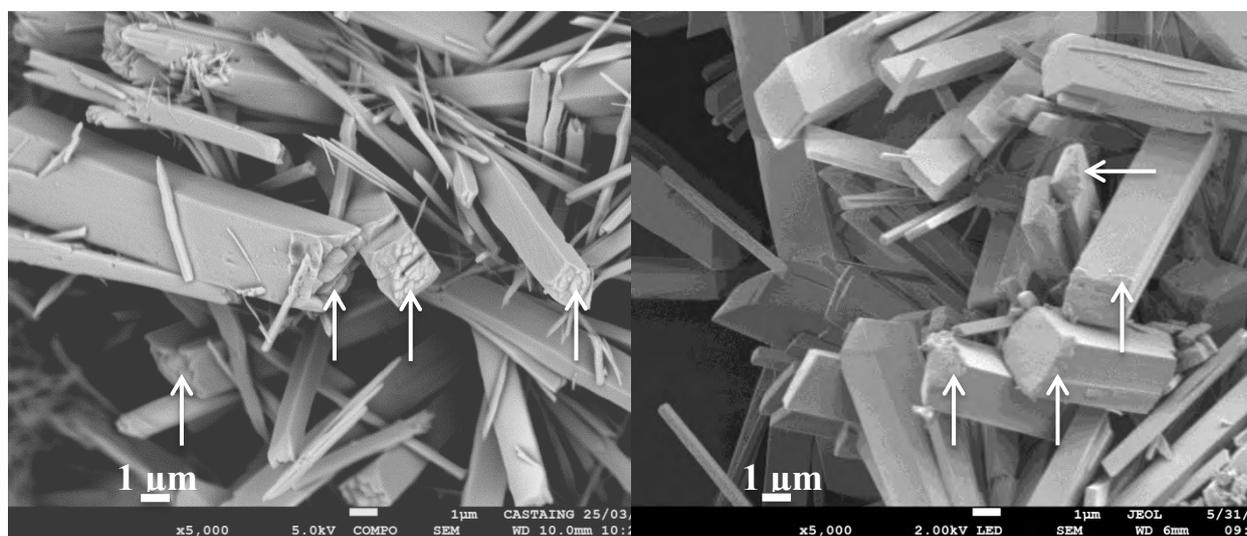
de t-CPPD en présence de Zn^{2+} , caractérisée par une vitesse initiale de croissance cristalline plus faible qu'en l'absence de Zn^{2+} est donc confirmé (Tableau III-6).



t-CPPD de référence (semence)

Après C4 (sans additif ionique)

Figure III-22- Images de microscopie électronique à balayage de la semence de t-CPPD et de la poudre obtenue suite aux essais de C4 à $\sigma = 3,5$ réalisés sans additif.



t-CPPD de référence (semence)

Après C4 en présence de 0,1 mM de Cu^{2+}

Figure III-23 – Images de microscopie électronique à balayage de la semence de t-CPPD et de la poudre obtenue suite aux essais de C4 à $\sigma = 3,5$ réalisés en présence de 0,1 mM de Cu^{2+} .

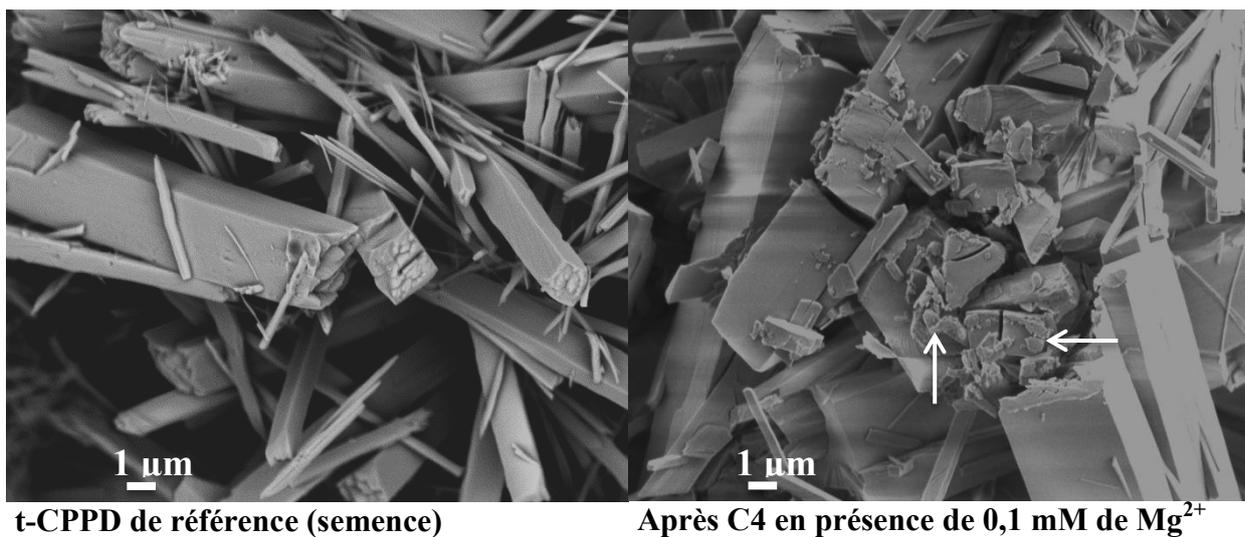


Figure III-24 – Images de microscopie électronique à balayage de la semence de t-CPPD et de la poudre obtenue suite aux essais de C4 à $\sigma = 3,5$ réalisés en présence de 0,1 mM de Mg²⁺.

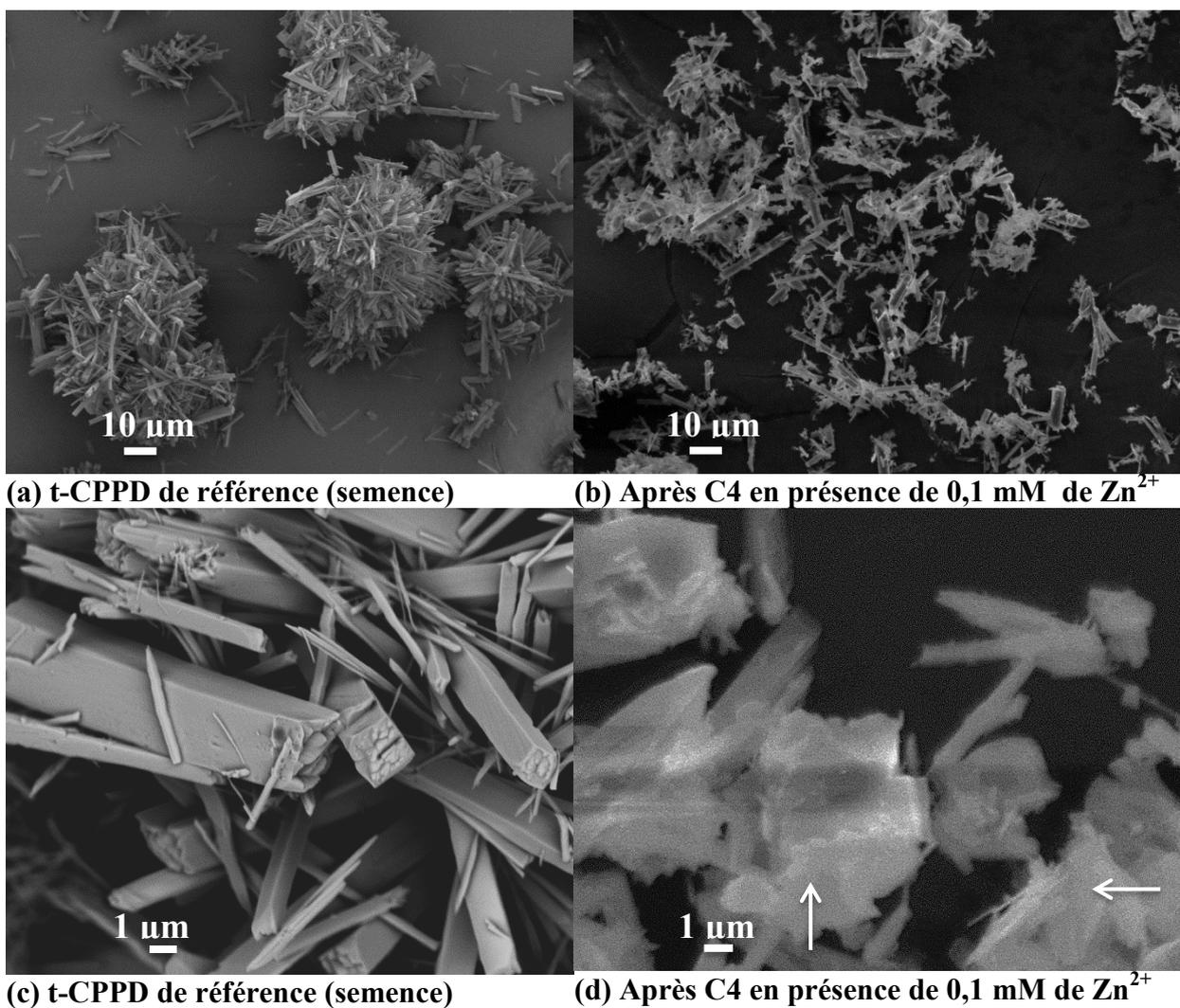


Figure III-25- Images de microscopie électronique à balayage de la semence de t-CPPD et des poudres obtenues suite aux essais de C4 à $\sigma = 3,5$ réalisés en présence de 0,1 mM de Zn²⁺.

III-3-6 Discussion

Nous avons vu précédemment que la croissance cristalline de la phase t-CPPD semble régie par des phénomènes de surface dépendant de la concentration en soluté à la surface de la semence de cristaux. Or des additifs (ions, protéines,...) peuvent retarder le processus de croissance cristalline en raison de leur présence à l'interface solution-cristal, ce qui peut entraîner l'inhibition totale de la croissance des cristaux, ou ces derniers peuvent continuer de croître à une vitesse plus lente avec d'éventuelles modifications de leur morphologie. Le ralentissement de la croissance cristalline est en général lié au recouvrement de la surface du cristal correspondant à une isotherme d'adsorption de Langmuir, elle-même liée à la concentration de l'impureté ou additif dans la solution (Christoffersen and Christoffersen, 1984), (Davey, 1976). Ce phénomène est également responsable de l'augmentation du temps nécessaire pour atteindre une taille critique des germes (temps d'induction) qui intervient toujours dans des systèmes contenant des adsorbants. A basse concentration en Zn^{2+} (0,1 mM) la croissance du t-CPPD est certainement inhibée à cause de l'adsorption de cet ion à la surface des germes de t-CPPD. Il en est de même pour de fortes concentrations en Mg^{2+} et des concentrations croissantes en Cu^{2+} jusqu'à ce que celles-ci soient trop importantes à la surface du cristal et inhibent totalement la croissance du t-CPPD.

Nous avons observé que l'effet des ions Cu^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} sur les cinétiques de croissance des cristaux de t-CPPD est dose dépendant. Lorsque la concentration en Cu^{2+} dans le milieu de précipitation augmente la croissance du t-CPPD est partiellement ($[Cu^{2+}] \leq 0,05$ mM) puis totalement inhibée ($[Cu^{2+}] \geq 0,05$ mM). Les effets les plus surprenants sont observés en présence d'ions Mg^{2+} et Zn^{2+} . Dans le cas du Mg^{2+} à faibles concentrations (0,1 mM) la cinétique de croissance est accélérée puis inhibée pour de fortes concentrations (0,5 et 1 mM). A l'inverse à faible concentration (0,1 mM) la présence d'ions Zn^{2+} inhibe la croissance de la phase t-CPPD et la favorise la croissance de m-CPPT β à forte concentration (0,5 et 1 mM). Il est intéressant de noter que la concentration physiologique du Zn^{2+} dans le plasma sanguin s'élève de 0,02 à 0,03 mM et 0,003 mM dans les globules rouges (Lindeman et al., 1971). Cette concentration dans le cas d'un patient sain correspond donc à la concentration du cas de l'inhibition de la croissance du t-CPPD. Notons aussi que la concentration en Cu^{2+} dans le liquide synovial d'un patient arthrosique est $1,10 \pm 1,65 \mu M$ (Halliwell and Gutteridge, 1985) et la concentration en Mg^{2+} libre dans le plasma sanguin est de 0,90 mM (Yajnik et al., 1984), (Oyane et al., 2003). Là aussi les concentrations physiologiques du Cu^{2+} et Mg^{2+} paraissent correspondre aux concentrations des cas de

l'inhibition de la croissance du t-CPPD. Cette observation paraît être en adéquation avec les résultats des synthèses de t-CPPD en présence d'additifs ioniques réalisées au chapitre II qui ont montré que les ions Zn^{2+} , Cu^{2+} et Mg^{2+} favorisent la croissance de la phase m-CPPD au détriment de la t-CPPD qui se trouve alors inhibée.

Il existe dans la littérature quelques cas où un même additif peut avoir deux effets opposés sur la cristallisation d'un composé selon sa concentration dans le milieu réactionnel. C'est notamment le cas des esters polyglycériques d'acides gras (PGFE) qui retarde la cristallisation de la stéarine de palme à basse concentration et qui la promeut à forte concentration (Shimamura et al., 2013). Shimamura *et al.* proposent d'expliquer l'effet antagoniste du PGFE observé dans leur étude par le fait que cet additif lorsqu'il est présent en forte quantité parvient à s'adsorber sur des sites de cristallisation et modifie l'orientation structurale de la stéarine de palme qui cristallise sous une autre variété polymorphe ce qui a pour effet d'accélérer sa formation. Combes et Rey (Combes and Rey, 2002) ont proposé lors d'une étude sur l'effet de l'albumine en tant qu'additif sur la cristallisation d'un orthophosphate de calcium (phosphate octocalcique), un mécanisme relativement similaire à celui décrit par Shimamura *et al.* et pouvant potentiellement expliquer les deux effets antagonistes de l'albumine observés. Notons que le composé étudié par Combes et Rey est un orthophosphate de calcium ce qui se rapproche le plus des CPP étudiés ici.

Par analogie avec les mécanismes observés dans les études précédemment citées nous pourrions expliquer les effets antagonistes observés sur la formation du t-CPPD obtenu pour différentes concentrations en ions Mg^{2+} et Zn^{2+} de la manière suivante :

Nous avons montré que dans le cas du t-CPPD le processus de germination à sa surface est contrôlé par des phénomènes surfaciques (liés à un gradient de concentration) impliquant notamment la diffusion. À de faibles concentrations en Mg^{2+} , la surface minérale du t-CPPD pourrait être trop peu recouverte d'additif ce qui permettrait à la croissance cristalline d'être alors plus rapide qu'en l'absence de Mg^{2+} en raison du grand nombre de petits germes et de leur plus grande réactivité. À des concentrations élevées en Mg^{2+} , la surface minérale de t-CPPD serait suffisamment recouverte pour permettre le ralentissement de la diffusion ionique à la surface du cristal et donc le ralentissement de la germination et de la croissance cristalline (sites de croissance bloqués ?). Cette analyse reste très hypothétique et mériterait d'être développée notamment en caractérisant la réactivité des surfaces comme cela a été fait précédemment dans la littérature.

Pour de fortes concentrations en Zn^{2+} (0,5 et 1 mM) la croissance du m-CPPT β est favorisée. Cela intervient probablement suite à une adsorption et une phase de diffusion des ions Zn^{2+} à la surface du cristal modifiant alors le mécanisme de croissance.

Nous avons identifié d'une part que la croissance du t-CPPD est principalement régit par des phénomènes de surface reste une variante d'une croissance à vitesse d'ordre > 1 contrôlée par la diffusion vers la surface ou à la surface des cristaux.

D'autre part l'étude de la synthèse de t-CPPD en présence d'ions Zn^{2+} chapitre II démontre que ce dernier peut se substituer au Ca^{2+} lors de la croissance de t-CPPD et ainsi orienter la formation de CPP vers la phase monoclinique dihydratée. Rappelons que durant les 6 premières minutes des essais de C4 réalisés en présence de 0,5 ou 1 mM Zn^{2+} qui correspondent à la partie des résultats d'enregistrement considéré pour déterminer une vitesse de croissance, le milieu n'est sursaturé que vis-à-vis de la phase t-CPPD ($\sigma = 3,5$). Ainsi seule la phase t-CPPD a pu précipiter.

A sursaturation relative égale, nous avons vu que les cristaux de CPP monoclinique (m-CPPD et m-CPPT β) ont des vitesses initiales de croissance cristalline plus rapides que celles du t-CPPD. La vitesse de croissance cristalline des cristaux de t-CPPD initialement formés et dopés avec des ions Zn^{2+} pourrait donc naturellement se rapprocher de celle des phases monocliniques. Puis, pour de fortes concentrations en Zn^{2+} la croissance du t-CPPD est probablement orientée vers la phase monoclinique la plus instable ayant pu précipiter (m-CPPT β).

III-4 Etude préliminaire de la minéralisation de ménisques arthrosiques

Après avoir identifié les effets de différents additifs ioniques d'intérêt biologique sur la formation et la vitesse de croissance de CPP une perspective intéressante serait de pouvoir confirmer et/ou étayer les effets observés dans un système se rapprochant du milieu vivant en mettant en œuvre notamment des tissus de l'articulation (cartilages ou ménisques). C'est pourquoi une étude préliminaire sur la cristallisation de CPP en présence de prélèvements de ménisques frais arthrosiques, présentant ou non des calcifications a été réalisée à l'aide de deux méthodes : la première mettant en œuvre la méthode de croissance cristalline à composition constante (C4) et la seconde une cellule de diffusion élaborée sur mesure. Les

spécimens biologiques de ménisques nous ont été fournis par le Pr Korng EA de l'Inserm U1132 à l'Hôpital Lariboisière (Paris) avec lequel nous collaborons.

III-4-1 Etude préliminaire via la méthode de C4

La mise en œuvre des essais de C4 réalisés en présence de matériel biologique et présentés par la suite comporte quelques différences de protocole par rapport aux essais précédents réalisés en présence de semences de cristaux de CPP. Les prélèvements de ménisques ont subi un traitement préalable avant d'être plongés dans la solution de travail. Après avoir été pesés ils ont été « équilibrés » dans une solution d'eau déionisée tamponnée à $\text{pH} = 6,22$. La manière d'introduire l'agent de germination change. Les poudres de semence de CPP étaient dispersées dans la solution alors que les prélèvements de ménisque sont suspendus à un fil de nylon dont on a vérifié qu'il ne provoque pas à lui seul la germination de CPP puis sont plongés dans la solution de travail.

La Figure III-26 présente les courbes d'évolution du pH et du volume de solutions titrantes ajoutées pour une sursaturation $\sigma = 3,5$ vis-à-vis de la phase t-CPPD à $\text{pH} 6,22$ et 37°C en présence d'un prélèvement issu de ménisques arthrosiques, nommés 38 ME et 34 ME (ME : ménisque externe), ne présentant initialement pas de calcifications visibles après observation à la loupe binoculaire et par radiographie standard sur film à grains fins de mammographie par le Dr Korng EA (Hôp. Lariboisière, Paris). Les expériences présentées ont été dupliquées avec deux prélèvements du même spécimen biologique. Sur chacune des courbes d'évolution du pH présentées, on note une augmentation de celui-ci malgré le fait que l'échantillon 38 ME ait été au préalable pré-équilibré dans une eau ultra pure tamponnée à $\text{pH} 6,22$ durant deux heures afin que chaque prélèvement de ménisque présente le même état d'hydratation avant la réalisation d'un essai de C4. L'augmentation de pH observée n'est pas régulière et ce dernier diminue par moment. Ces diminutions pourraient correspondre à la précipitation de CPP. Cependant la valeur du pH reste supérieure à la valeur de consigne ($\text{pH} 6,22$) durant les 200 premières minutes de l'essai de C4. Les diminutions de pH potentiellement dues à une précipitation de CPP observées par la suite, ne suffisent pas à redescendre au pH de consigne et à déclencher le système : aucun ajout de solution titrante n'est alors réalisé. Or sans courbe d'ajout de solution titrante en fonction du temps nous ne pouvons pas déterminer de valeur de dV/dt . De plus la masse des spécimens biologiques utilisés doit être pesée avant tout essai de C4 et il faudrait que la masse des cristaux éventuellement formés soit détectable lors de la pesée du spécimen biologique après essai de

C4 pour permettre de calculer une vitesse de croissance R_c . Il n'est donc actuellement pas possible de déterminer une vitesse de croissance R_c en cas de formation de CPP au vu du comportement de ce système au cours de l'expérience. Notons qu'avec une valeur de pH comprise entre 6,22 et 6,30 durant l'essai de C4 la sursaturation relative vis-à-vis du t-CPPD est comprise entre $\sigma = 3,5$ et 4,3. La solution de travail reste sous saturée vis-à-vis des autres phases cristallines de CPP (Tableau III-2).

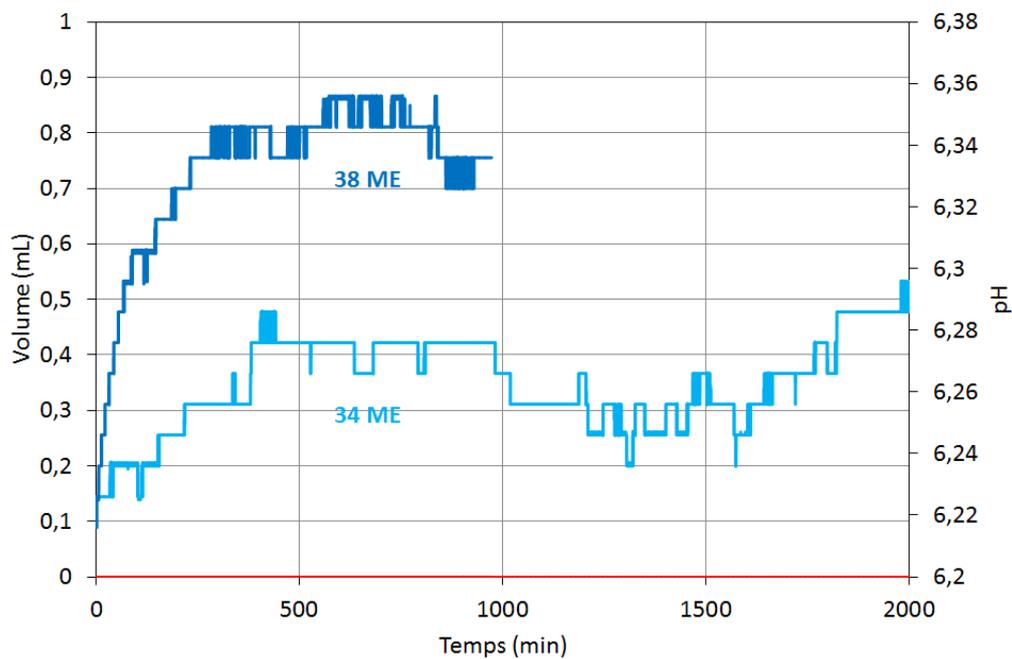
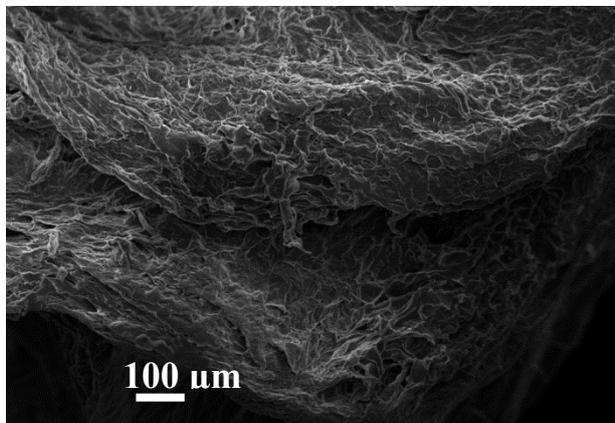


Figure III-26- Courbes d'évolution du pH (bleu) et du volume de solutions titrantes ajoutées (rouge) pour une sursaturation $\sigma = 3,5$ à pH 6,22 en présence des prélèvements de ménisque arthrosique nommés 38 ME et 34 ME ne présentant initialement pas de calcifications visibles.

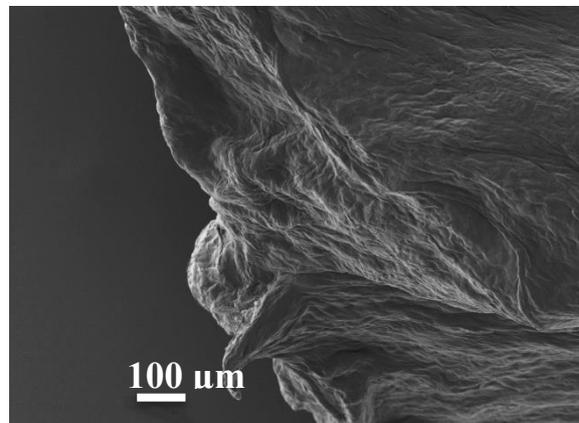
La Figure III-27 et la Figure III-28 présentent des images de microscopie électronique à balayage à différents grossissements des prélèvements 38 ME et 34 ME à l'issue de l'essai de C4. Le prélèvement de ménisque 38 ME présente une structure pourvue de pores visiblement plus grands et nombreux que ceux du prélèvement 34 ME (Figure III-27). La présence de calcifications est observée à la surface de chacun des deux prélèvements de ménisque externe. En revanche, il n'est pas possible de distinguer à partir des calcifications du 34 ME une morphologie caractéristique d'une phase de CPP alors que certains cristaux suffisamment gros présents à la surface du 38 ME présentent une morphologie caractéristique de cristaux aciculaires de t-CPPD (Figure III-23). Il est important de noter qu'après chaque essai de C4

les prélèvements de ménisques récupérés ont été abondamment rincés à l'eau ultra pure avant d'être séchés. Cela signifie que les calcifications observées sur les prélèvements de ménisque externe ont bien germé et poussé à la surface du ménisque ; on est dans le cas d'une cristallisation hétérogène sur un substrat de nature différente que celle de la phase cristallisée qui se forme à sa surface.

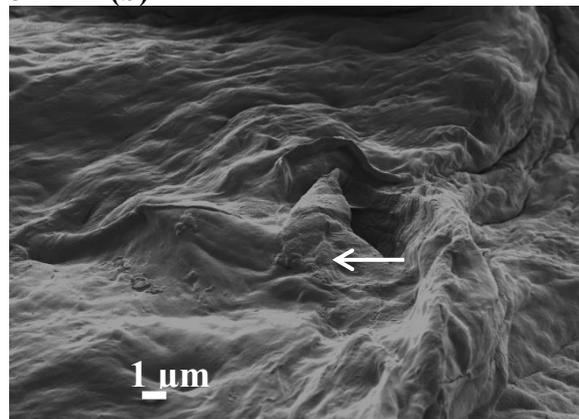
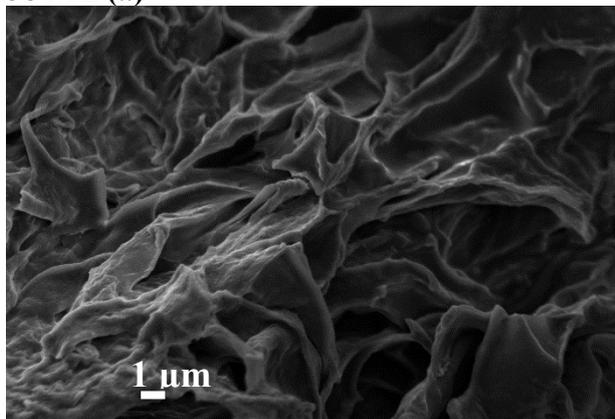
La configuration du système C4 utilisé permet ici une cristallisation très rapide vis-à-vis des durées du processus de formation de ces cristaux *in-vivo* qui pourrait se compter en mois et/ou années. Sachant que des cristaux de CPPD ont déjà régulièrement été observés par les médecins partenaires de ce projet au sein de spécimens de ménisques arthrosiques, une étude approfondie par le biais d'un tel système pourrait fournir un moyen d'étudier la question du lieu de formation (surface ou intérieur du cartilage et/ou liquide synovial) des cristaux de CPPD à l'origine des calcifications observées *in-vivo*. De plus les calcifications observées sur le spécimen 38 ME semblent s'être préférentiellement formées à l'intérieur et autour de pores (Figure III-28). Cette observation va de pair avec le fait que l'échantillon présentant l'état de calcification le plus avancé, soit l'échantillon 38ME, présente la surface la plus « rugueuse » et avec de grands pores (Figure III-27).



38 ME (a)



34 ME (b)



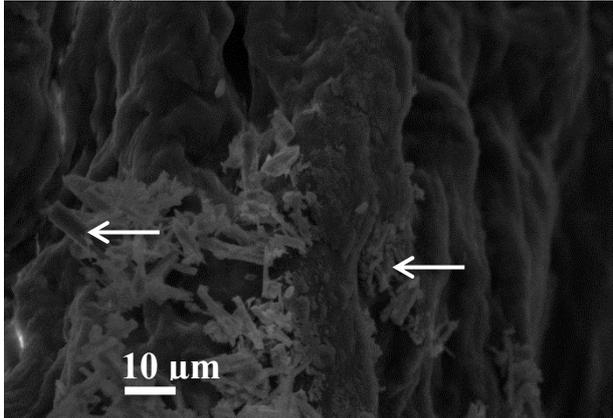
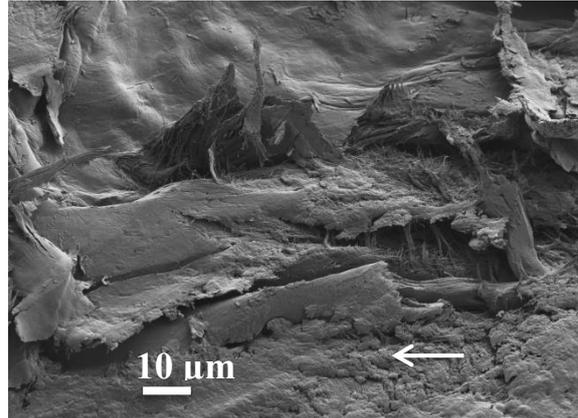
38 ME (c)**34 ME (d)****38 ME (e)****34 ME (f)**

Figure III-27- Images de microscopie électronique à balayage des prélèvements 38 ME et 34 ME suite aux essais de C4 à pH 6,22 et $\sigma = 3,5$ vis-à-vis de la phase t-CPPD.

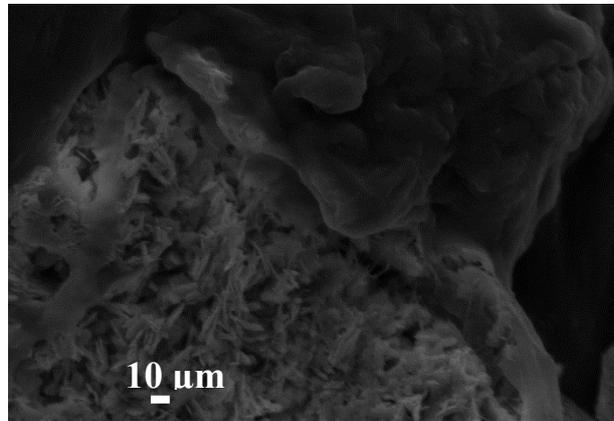
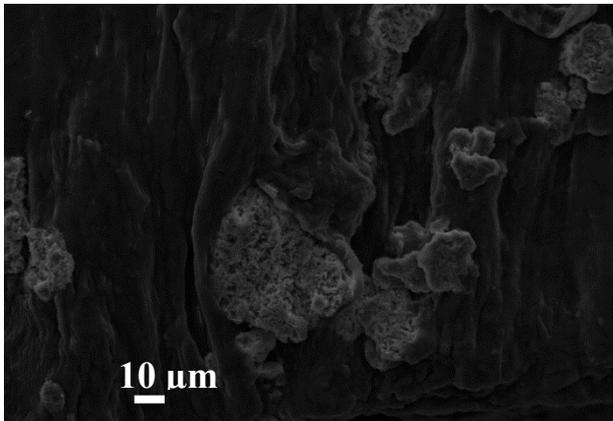
**38 ME (a)****38 ME (b)**

Figure III-28- Images de microscopie électronique à balayage à fort grandissement ds prélèvements 38 ME présentant des calcifications suite aux essais de C4 à un pH 6,22 et $\sigma = 3,5$ vis-à-vis de la phase t-CPPD.

III-4-2 Etude dynamique en cellule de diffusion

III-4-2-1 Description du dispositif et protocole expérimental

L'approche développée ici a pour but de permettre la réalisation d'un schéma de précipitation peu ou pas pris en compte avec la méthode de C4. Il s'agit ici de forcer la diffusion des ions calcium et pyrophosphate au sein du spécimen de ménisque, poreux par définition. La diffusion et la rencontre de ces ions peut conduire à une précipitation qui peut avoir lieu sur une très grande échelle de temps dans un contexte biologique. Il s'agit donc ici de les reproduire à une échelle de temps de laboratoire raisonnable. Le spécimen testé avec ce dispositif est différent de ceux analysés par C4 en raison du problème de disponibilité d'un

même spécimen en suffisamment grande quantité qui ne permet pas de doubler chaque expérience avec chacune des techniques pour pouvoir comparer les résultats.

Le schéma de la cellule de diffusion et des photos du dispositif expérimental de cristallisation en cellule de diffusion sont présentés sur la Figure III-29. La préparation et le déroulement des manipulations se font selon le protocole décrit ci-dessous.

Un prélèvement de ménisque est obtenu sous forme de disque de 6 mm de diamètre à l'aide d'un punch à biopsie ; il est ensuite placé jusqu'en butée dans le conduit de la cellule prévu à cet effet Figure III-29. La circulation continue d'une solution sursaturée métastable de pyrophosphate de calcium au travers de ce prélèvement de ménisque est assurée par une pompe péristaltique montée en série avec la cellule et la bouteille de solution, toutes deux thermostatées à 37°C à l'aide d'un bain marie dans lequel elles restent immergées pendant toute la durée de l'expérience. La solution sursaturée est à un pH initial égal à 6,22 et présente une sursaturation relative initiale vis-à-vis des phases t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT β respectivement égale à 24, 4,5 et 1,4. Un faible débit de 1 mL.min⁻¹ est utilisé. Contrairement au dispositif de C4, la diminution de la concentration en ions dans la solution sursaturée métastable au cours du temps n'est pas compensée par l'ajout de solutions titrantes ce qui limite la quantité de CPP qui peut précipiter. De plus, la métastabilité de la solution impose que celle-ci finisse par précipiter après un temps d'attente relativement long selon la sursaturation choisie. C'est pourquoi un renouvellement journalier de la solution sursaturée a été choisi : la bouteille de solution sursaturée est remplacée par une bouteille de solution fraîchement préparée pour ramener la sursaturation à sa valeur de départ.

Les diverses manipulations du matériel biologique (ménisque) sont réalisées sur une surface parfaitement nettoyée à l'éthanol et sous une hotte à flux laminaire. Le matériel utilisé (punch, scalpel, pince brucelles, tuyaux de la cellule de diffusion...) est stérile ou soigneusement nettoyé à l'éthanol. Le dispositif une fois scellé et monté en série est parfaitement étanche et donc non exposé aux pollutions extérieures.

Les prélèvements de ménisques récupérés suite à ces essais durant 5 jours, sont ensuite conservés au réfrigérateur dans des eppendorfs. Ils sont ensuite abondamment rincés à l'eau déionisée puis séchés à température ambiante pendant une durée minimum de 12 h au dessiccateur avant d'être observés par microscopie électronique à balayage.

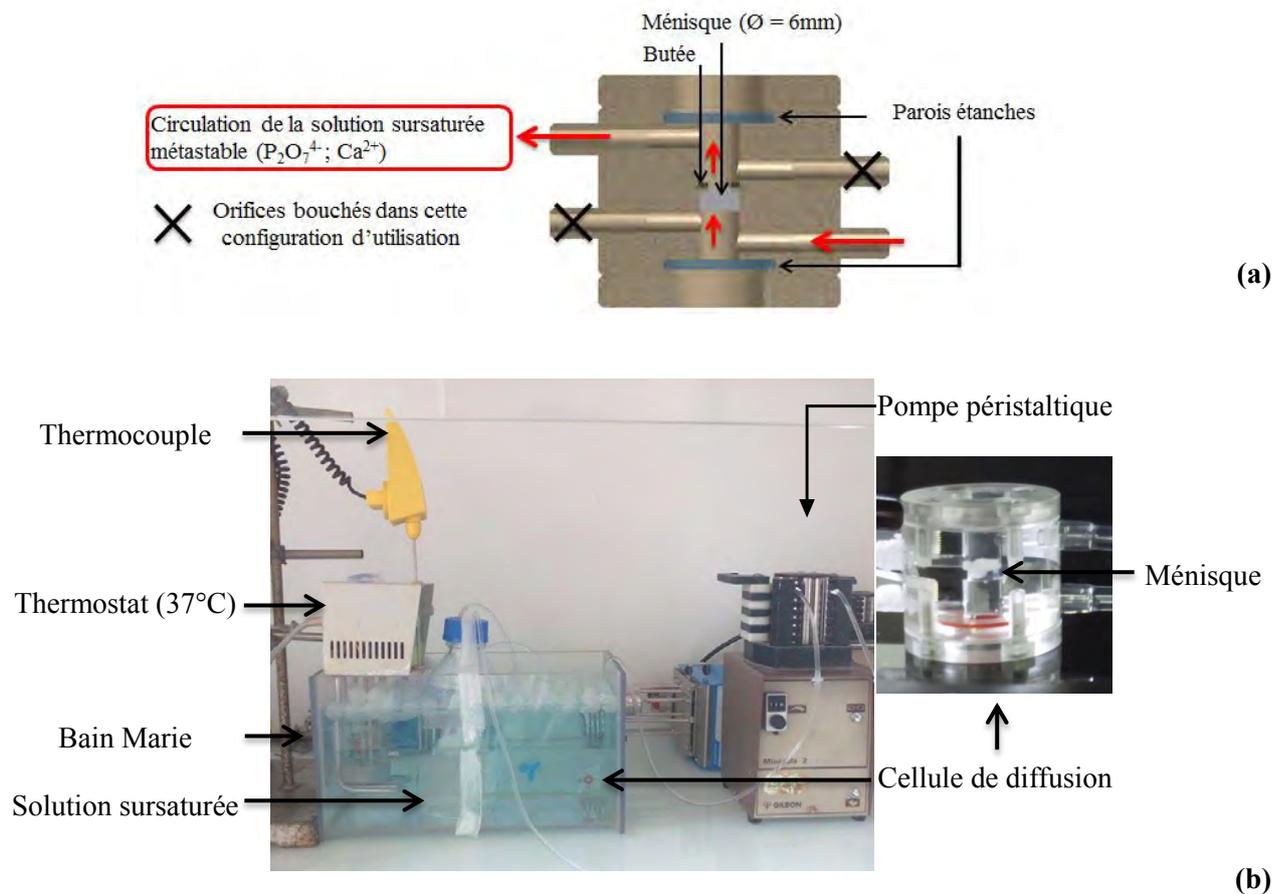
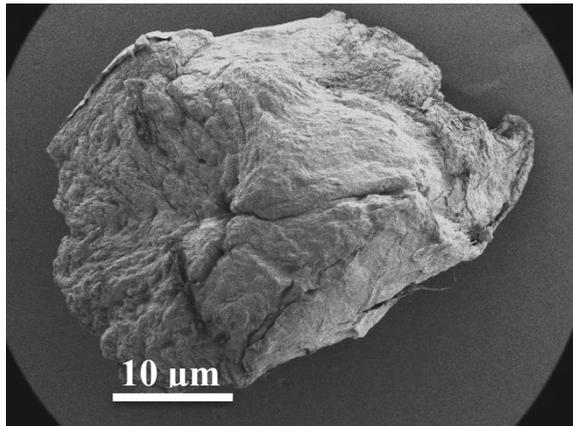


Figure III-29- Schéma de la cellule de diffusion (a) et photos du dispositif expérimental de cristallisation en cellule de diffusion (b).

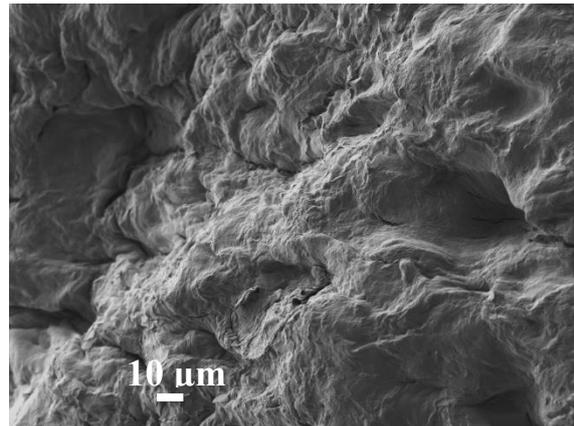
La précipitation en cellule de diffusion permet de faire diffuser une solution sursaturée métastable d'ions pyrophosphates et calcium au travers d'un ménisque arthrosique faisant office, comme dans le cas de l'étude avec la C4, de substrat pour la cristallisation de CPPD. Bien que le ménisque ait une structure poreuse tout liquide dans lequel celui-ci peut être plongé ne passera pas spontanément et rapidement au travers dans un temps imparti et limité. La différence notable entre la méthode de cristallisation en cellule de diffusion et la méthode C4 réside dans le fait que l'on force le passage à travers le spécimen biologique contrairement au cas de la C4. Les conditions hydrodynamiques sont donc différentes. *In vivo* la formation de CPP se déroule probablement sur un temps long (peut être plusieurs années selon les patients) et des calcifications de CPPD ont été identifiées dans n'importe quelle couche du ménisque. Ceci laisse supposer que la diffusion des ions à l'origine de cette cristallisation *in-vivo* peut avoir lieu au sein du ménisque jusque dans ces couches les plus profondes. Ce dispositif en cellule de diffusion a donc été mis point pour simuler *in-vitro* en un temps imparti bien inférieur à plusieurs années ce phénomène de diffusion.

III-4-2-2 Résultats expérimentaux et discussion

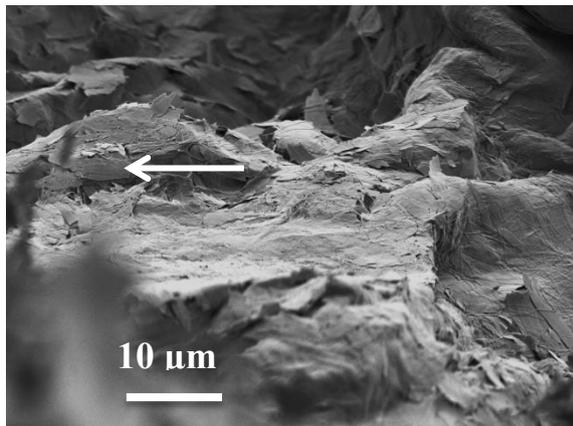
Un prélèvement de ménisque arthrosique nommé 37 ME ne présentant pas de calcifications visibles après observation par le Dr Korng EA (Hôp. Lariboisière, Paris) a été introduit dans la cellule de diffusion pendant une durée arbitraire de 5 jours pour laisser le temps à d'éventuels cristaux de se former. La sursaturation n'étant pas strictement contrôlée (bouteille de solution sursaturée changée trois fois pendant la journée à 4 heures d'intervalle) en cas de précipitation celle-ci diminue jusqu'à peut-être devenir nulle. La Figure III-30 présente des images de microscopie électronique à balayage à différents grossissements du prélèvement 37 ME présentant des calcifications suite au séjour en cellule de diffusion traversée par une solution sursaturée à un pH initial de 6,22. La surface du prélèvement de ménisque 37 ME (Figure III-30 ; (b)) est moins poreuse et présente des pores plus petits que ceux du spécimen 38 ME (Figure III-27 ;(e)) mais bien moins lisse que la surface du spécimen 34 ME (Figure III-27 ;(f)). L'observation de cet échantillon révèle la présence de particules sous forme de feuillettes à la surface du ménisque (Figure III-31c et III-31d) qui pourraient s'apparenter à des cristaux de la phase m-CPPT β au départ de leur croissance (Figure III-31e). Cette dernière figure qui représente une image de microscopie électronique à balayage de cristaux de la phase m-CPPT β purs (vérifié par spectroscopie FTIR, Figure III-6) très fins ayant poussés sur une phase de t-CPPD et obtenus suite à un essai de C4 à forte sursaturation ($\sigma = 292$; Figure III-5). Cette hypothèse pourrait être étayée lors d'une étude plus approfondie notamment par une analyse et cartographie élémentaire par EDX ainsi qu'une de l'extrême surface par XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy). La solution sursaturée métastable utilisée pour cet essai l'était vis-à-vis de la phase m-CPPT β ce qui est en cohérence avec la possibilité que le dépôt observé de ce type de cristaux. Rappelons que cette phase à ce jour non identifiée au sein de ménisques arthrosiques est un précurseur *in-vitro* des phases de CPPD identifiées *in-vivo*.



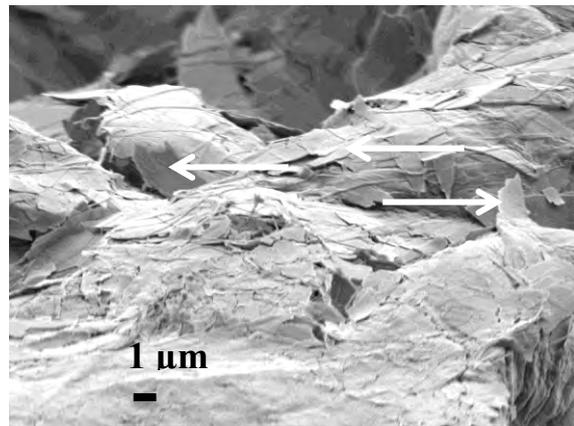
37 ME (a)



37 ME (b)



37 ME (c)



37 ME (d)

Figure III-30 - Images de microscopie électronique à balayage à différents grossissements du spécimen 37 ME présentant des calcifications suite à un séjour de 5 jours en cellule de diffusion traversée par une solution sursaturée à un pH initial de 6, 22.

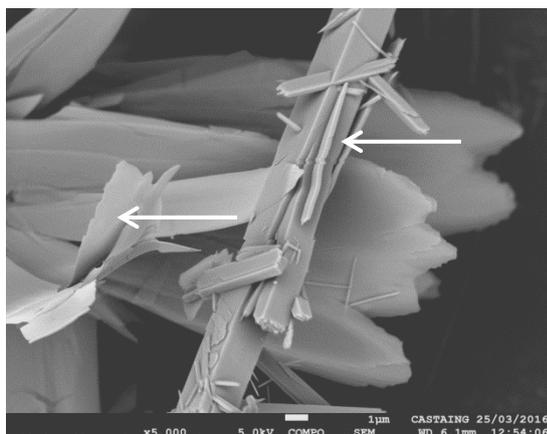


Figure III-31- Images de microscopie électronique à balayage de cristaux de la phase m -CPPT β (a) ayant poussé sur une semence de t -CPPD (b).

III-5 Conclusion et perspectives

En référence aux objectifs que nous nous étions fixés et dans la perspective d'une meilleure connaissance des processus impliqués dans la croissance de cristaux de CPP d'intérêt biologique en présence de différents d'additifs ioniques (Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}), nous allons rappeler les principaux résultats obtenus lors de cette étude.

Un système de croissance cristalline à composition constante a été mis point avec des paramètres permettant pour la première fois et dans le cadre d'une étude préliminaire de suivre la cristallisation homogène de différentes phases de CPP hydraté à la surface d'une semence de la même phase. La technique de C4 nous a alors permis de déterminer la cinétique de germination et de croissance cristalline du t-CPPD sur une semence de t-CPPD, mais aussi pour une sursaturation donnée le temps d'induction et la vitesse initiale de croissance homogène des phases m-CPPD et m-CPPT β sur une semence respectivement de m-CPPD et m-CPPT β . Puis nous avons étudié l'influence des ions Cu^{2+} , Mg^{2+} ou Zn^{2+} sur la cinétique de croissance du t-CPPD. Enfin, des premiers essais de croissance hétérogène de CPP à la surface de prélèvements de ménisques arthrosiques humains comme substrat ont été réalisés. Ces deux derniers points représentent une étude préliminaire ouvrant les perspectives de parvenir à obtenir des résultats plus « robustes » lors de futures campagnes d'analyses avec notamment un plus grand nombre de spécimens biologiques à disposition et d'essais.

Nous avons montré que l'effet des ions Cu^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} sur les cinétiques de croissance des cristaux de t-CPPD est dose dépendant. Lorsque la concentration en Cu^{2+} dans le milieu de cristallisation augmente la croissance du t-CPPD est partiellement ($[\text{Cu}^{2+}] \leq 0,05$ mM) ou totalement inhibée ($[\text{Cu}^{2+}] \geq 0,05$ mM). Les effets les plus surprenants sont observés en présence d'ions Mg^{2+} et Zn^{2+} . Dans le cas du Mg^{2+} à faibles concentrations (0,1 mM), la vitesse initiale de croissance cristalline est accélérée ; en revanche, elle est inhibée pour de fortes concentrations (0,5 et 1 mM). Enfin, à faible concentration (0,1 mM), la présence d'ions Zn^{2+} inhibe la croissance de la phase t-CPPD et la favorise à forte concentration (0,5 et 1 mM).

Nous avons émis l'hypothèse que ces effets sont dus au mécanisme de croissance du t-CPPD principalement régit par la surface et le gradient de concentration en ions que l'on y trouve et enfin par la diffusion de ces ions. Lorsque les ions Cu^{2+} et Mg^{2+} sont présents en

quantité suffisamment importante et que les ions Zn^{2+} sont présents à faibles concentrations ils pourraient s'adsorber à la surface du substrat de t-CPPD et alors parviennent à la recouvrir de manière à ralentir ou bloquer sa croissance. Des analyses par spectrométrie photoélectronique X (en anglais, X-Ray photoelectron spectrometry : XPS) présente une perspective intéressante pour étayer cette hypothèse. En revanche à forte concentration, on peut supposer en considérant également les résultats de l'étude réalisée au chapitre II (précipitation du t-CPPD en présence de Zn^{2+}), que l'ion Zn^{2+} s'intègre probablement dans la maille de t-CPPD à la place d'ions Ca^{2+} et oriente la formation d'une phase monoclinique à la vitesse de croissance plus rapide que celle de la phase t-CPPD. Enfin lorsque des ions Mg^{2+} sont présents dans le milieu de précipitation en faible quantité, l'augmentation de la surface d'espèces minérales ne peut pas être suffisamment recouverte par l'additif et la croissance cristalline se produit à un rythme plus rapide qu'en l'absence de Mg^{2+} , en raison du grand nombre de petits noyaux et de leur plus grande réactivité.

Des systèmes simplifiés (C4 ou cellule de diffusion) en présence de matériel biologique (ménisques) ont été mis au point dans le but de réaliser une étude préliminaire *in-vitro* à partir de modèles et dans des conditions se rapprochant au moins localement, des conditions rencontrées dans le corps humain. Les résultats obtenus en présence de ménisques montrent qu'il est possible de faire croître *in-vitro* des cristaux de CPP sur un ménisque comme substrat. Du t-CPPD a été identifié dans ces conditions mais il semblerait aussi que la phase m-CPPT β , précurseur *in-vitro* des phases de CPPD observées *in-vivo*, pourrait éventuellement croître à la surface de ménisque sous réserve d'analyses chimiques complémentaires. Il semble aussi que la propension d'un ménisque à calcifier pourrait dépendre de sa microstructure plus ou moins poreuse ou « lisse » probablement en lien avec son état d'altération. Cette étude préliminaire donne des perspectives sur la possibilité de réaliser de futures campagnes d'analyses avec un plus grand nombre de spécimens biologiques et d'essais afin d'obtenir des résultats statistiquement plus robustes. A noter toutefois que nous sommes malheureusement limités par la disponibilité de spécimens biologiques en suffisamment grande quantité pour pouvoir au minimum dupliquer les essais avec un même spécimen. A terme de tels types de campagnes d'analyses pourraient permettre de reproduire en accéléré les phénomènes ayant lieu *in-vivo* et ainsi ouvrir un nouveau champ de possibilités pour réaliser de futures études de l'influence d'additifs ioniques sur la calcification de ménisque. Pour extraire des informations telle que la présence d'un temps d'induction ou une vitesse de croissance il faudra néanmoins trouver une méthode de

préparation des échantillons pour palier à l'augmentation de pH due à l'utilisation de prélèvements de ménisque comme semence.

Conclusion générale

L'arthrose est une maladie dont les causes sont encore mal comprises et les traitements disponibles à ce jour sont uniquement symptomatiques. La présence de microcristaux de pyrophosphates de calcium dihydratés ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CPPD mono- et/ou triclinique) au niveau des articulations a été identifiée comme l'un des facteurs aggravants de la maladie.

En abordant ce travail de thèse, plusieurs questions se posaient :

- Quels sont les mécanismes de formation de ces microcristaux *in vivo* et *in vitro*?
- Quelle variété polymorphe est formée la première au cours de la précipitation ?
- Quelles sont les cinétiques de cristallisation des phases m- et t-CPPD *in vitro* et quels sont les paramètres qui influencent ces cinétiques ?
- Peut-on inhiber le développement de certaines phases cristallines par la présence d'additifs ioniques naturellement présents dans le corps
- quel est le rôle du cartilage présent dans l'articulation sur la cristallisation de ces phases ?

Dans ce travail nous avons mis en place des méthodologies permettant d'apporter des éléments de réponse à ces questions.

En premier lieu, une analyse bibliographique a permis de rassembler les connaissances disponibles sur la précipitation de pyrophosphates de calcium dihydratés et de poser les bases d'une étude sur des additifs promoteurs de dissolution ou inhibiteurs de la cristallisation de ces cristaux. Ainsi, nous nous sommes appuyés sur les travaux antérieurs de Pierre Gras (2014) pour mettre au point une méthode de synthèse de ces phases en réacteur parfaitement agité et développer des méthodes de caractérisation. Les différents travaux effectués précédemment sur la cristallisation et la dissolution des CPPD ont montré que quelques additifs ioniques ont une influence sur la cristallisation et la dissolution des pyrophosphates de calcium, en particulier l'ion Mg^{2+} . Cette analyse bibliographique a également mis en évidence la difficulté d'obtenir des phases de pyrophosphate de calcium pures, et d'obtenir des données fiables de solubilité ou de cinétiques de cristallisation.

Une première étape du travail a donc porté sur le développement d'un protocole de synthèse fiable des différentes phases de pyrophosphate de calcium hydraté d'intérêt biologique. Un dispositif et un protocole de précipitation permettant un contrôle fin de la

température, du pH et des débits d'ajouts des réactifs ont été mis au point. Les phases de pyrophosphates de calcium hydratés, t-CPPD, m-CPPD, m-CPPT β et a-CPP presque pures, ont été produites par addition simultanée, à débit contrôlé, des deux solutions de réactif (pyrophosphate de potassium et nitrate de calcium) dans une solution tampon d'acétate d'ammonium. Cette méthode rapide et reproductible permet de produire *in-vitro* des quantités suffisantes de produits permettant de réaliser une caractérisation exhaustive.

Les phases obtenues ont été caractérisées en détail à l'aide de la diffraction des rayons X, de la spectrométrie FTIR, de la résonance magnétique nucléaire du solide du ^{31}P , de la microscopie électronique à balayage et d'analyses élémentaires par spectrométrie à plasma à couplage inductif.

L'addition de différents additifs ioniques (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} ou $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) dans le réacteur au cours de la cristallisation des phases m-CPPD, t-CPPD et m-CPPT β a été étudiée. Nous avons montré que certains de ces additifs ioniques ont un effet plus ou moins marqué sur la formation de ces phases. Ils peuvent inhiber partiellement ou totalement la cristallisation des phases CPPD au potentiel inflammatoire élevé. La cristallisation de la phase t-CPPD est par exemple complètement inhibée par l'ion Fe^{3+} , et partiellement inhibée par les ions Cu^{2+} et Zn^{2+} . Les analyses par RMN du solide ont permis de montrer notamment pour les additifs ioniques paramagnétiques tels que Fe^{3+} ou Cu^{2+} , qu'ils s'insèrent dans le réseau de la phase de CPP hydraté précipité qu'elle soit cristallisée ou amorphe. Ces additifs peuvent donc s'adsorber ou s'insérer dans le réseau cristallin des CPP. Une des hypothèses avancées est que la phase cristalline la moins stable des phases dihydratées (m-CPPD) se forme en premier, puis évolue en t-CPPD. Dans ce cas, les additifs ioniques étudiés ici (Cu^{2+} , Zn^{2+} et Mg^{2+}) stabiliseraient la phase m-CPPD et l'empêcheraient d'évoluer vers du t-CPPD. Bien que ces résultats n'apportent pas de réponse directement à la problématique médicale notamment parce que la phase m-CPPD est la plus inflammatoire, ils contribuent à mieux appréhender les raisons de l'apparition potentielle d'une phase de CPP plutôt qu'une autre au sein des articulations arthrosiques. Ces résultats sont ainsi disponibles pour de futures études de cristaux pathologiques et permettent d'améliorer la compréhension de pourquoi, comment et dans quel ordre les cristaux de CPPD se forment-ils au sein d'articulation arthrosiques. Ils interrogent d'ailleurs sur la présence potentielle de la phase amorphe dans les articulations et sur les évolutions que pourrait subir celle-ci, pouvant conduire à la présence des cristaux de t-CPPD et m-CPPD observés *in vivo*.

Afin de fournir des données originales sur les cinétiques de germination et de croissance cristalline des phases de CPP hydraté, nous avons mis en œuvre et démontré la faisabilité de la technique de croissance cristalline à composition constante (sursaturation constante notamment) appliquée à l'étude de la cristallisation homogène des phases m-CPPD, t-CPPD et m-CPPT β sur une semence de m-CPPD, t-CPPD et m-CPPT β respectivement. Pour chacune de ces phases, nous avons pu déterminer les paramètres cinétiques (temps d'induction et vitesse initiale de croissance cristalline) dans des conditions de cristallisation à sursaturation constante à 37°C et à pH légèrement inférieur au pH physiologique. Cette technique nous a également permis de réaliser une étude préliminaire sur l'influence des ions Cu^{2+} , Mg^{2+} ou Zn^{2+} sur la cinétique de croissance du t-CPPD. Nous avons montré que l'effet de ces ions sur les cinétiques de croissance des cristaux de t-CPPD est dose dépendant.

Par ailleurs, des premiers essais de croissance hétérogène de CPP hydraté à la surface de prélèvements de ménisques arthrosiques humains comme substrat ont été réalisés à l'aide de la technique de croissance cristalline à composition constante. Ces travaux préliminaires ouvrent des perspectives de parvenir à des résultats plus « robustes » lors de futures campagnes d'expériences avec notamment un plus grand nombre de spécimens biologiques à disposition et d'essais. La réalisation d'une future étude en présence de matériel biologique (ménisque ou cartilage) et d'un additif ionique pourrait permettre d'étayer et compléter les résultats déjà obtenus

Ainsi l'ensemble de ces travaux ont permis la description des cristaux de pyrophosphate de calcium et leur évolution *in vitro* en présence d'additifs d'intérêt biologique et thérapeutique dans des conditions contrôlées. Ils avaient pour objectif à moyen ou long terme d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes de formation des cristaux observés *in-vivo* et de procurer des éléments permettant la mise au point d'un traitement thérapeutique des maladies à cristaux de CPPD.

Une grande partie des perspectives à long terme de ce travail consistera à étudier les mécanismes de germination, de croissance et de dissolution de ces phases dans un système reproduisant au mieux le milieu biologique combiné à la présence d'additifs ioniques. Pour ce faire les travaux de l'étude préliminaire réalisée en présence de matériel biologique à l'aide de la croissance cristalline à composition constante et en cellules de diffusion seront poursuivis et approfondis. La cellule de diffusion est notamment scellée avec des parois transparentes et

parallèles se situant de part et d'autre du prélèvement biologique étudié. Elles ont été prévues pour permettre l'observation et l'analyse *in situ*, via des techniques de microscopie et spectroscopie, de l'évolution des phases de CPP formées. D'autre part, les études précédemment réalisées avec les méthodes citées portent principalement sur la formation de la phase t-CPPD et seront donc reproduites dans des conditions favorables à la formation de l'autre phase d'intérêt biologique identifiée *in-vivo*, c'est-à-dire la phase m-CPPD. Les effets observés grâce à la combinaison de toutes ces méthodes en présence de ces différents additifs sur les processus étudiés devront être évalués et mis à profit afin, à moyen terme, de ralentir voire inhiber la formation de cristaux *in vivo* et/ou de favoriser leur dissolution dans les cas d'arthrose déclarée. Le but à long terme étant la conception d'un traitement permettant d'enrayer la dégradation de l'articulation associée à la présence de microcalcifications.

Concernant les perspectives à court terme, très prochainement une étude approfondie sur le rôle du Zn^{2+} et Cu^{2+} dans la formation *in-vitro* des phases m-CPPD et t-CPPD ainsi que la détermination des environnements structuraux de ces ions dans les phases cristallines CPP d'intérêt biologique sera réalisée (Proposal n° 20160477 du 28/09/2016 au 03/10/2016) sur la ligne DIFFABS du synchrotron SOLEIL à Gif sur Yvette (91). Cette étude combinera des analyses par diffraction et absorption des rayons X aux seuils K du cuivre et du zinc en utilisant une source de rayonnement synchrotron. L'utilisation du rayonnement synchrotron permet d'atteindre des rapports signal/bruit des diagrammes RX et spectres d'absorption des RX ainsi, qu'une résolution fortement améliorée par rapport à ceux atteints à l'aide d'outils de laboratoire ce qui devrait permettre d'obtenir des informations structurales fines et complémentaires à celles déjà fournies par DRX de laboratoire et RMN du solide notamment sur les phases de CPP dopées en Cu^{2+} ou Zn^{2+} . Une telle étude devrait permettre d'améliorer la sensibilité et les chances de succès de la détermination des environnements locaux des ions Cu^{2+} et Zn^{2+} et leur localisation structurales préférentielle dans les différentes structures de CPP d'une part, mais aussi d'enrichir nos connaissances sur la formation de cristaux de CPP en présence de ces éléments, notamment sur la manière dont ils peuvent empêcher la formation ou l'orienter *in-vivo* vers des phases de CPP non-inflammatoires et par conséquent permettre de comprendre comment il serait possible d'inhiber ou modifier leur formation.

Les collaborations inter- et pluridisciplinaires enrichissantes développées dans le cadre de cette thèse ont permis d'avancer sur la compréhension de la formation et de l'évolution *in-vitro* et *in-vivo* des pyrophosphates de calcium hydratés d'un point de physico-chimique, mais

il reste encore de nombreuses étapes à franchir pour prévenir ou traiter plus efficacement ces microcalcifications pathologiques.

Références bibliographiques

- Abraham, A., 1961. *The Principles of Nuclear Magnetism*. Clarendon Press.
- Adirekkiat, S., Sumethkul, V., Ingsathit, A., Domrongkitchaiporn, S., Phakdeekitcharoen, B., Kantachuvesiri, S., Kitiyakara, C., Klyprayong, P., Disthabanchong, S., 2010. Sodium thiosulfate delays the progression of coronary artery calcification in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25, 1923–1929.
- Amathieu, L., Boistelle, R., 1986. Improvement of the mechanical properties of set plasters by means of four organic additives inducing {101} faces. *J. Cryst. Growth* 79, 169–177.
- Amelinckx, S., 1950. Phenomenes de diffusion pendant la croissance et la dissolution de cristaux dans une solution. *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.* 47, 208–212.
- Amjad, Z., 1991. Constant composition study of crystal growth of calcium fluoride. Influence of poly(carboxylic acids), polyphosphates, phosphonates, and phytate. *Langmuir* 7, 600–603. doi:10.1021/la00051a032
- Anghileri, L.J., 1992. Soft tissue calcification induced by iron complexes. *Calcif. Tissue Int.* 51, 83–84.
- Baeuerlein, E., 2000. *Biom mineralization: from biology to biotechnology and medical applications*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Balić-Žunić, T., Christoffersen, M.R., Christoffersen, J., 2000. Structure of the β form of calcium pyrophosphate tetrahydrate. *Acta Crystallogr. B* 56, 953–958.
- Bazin, D., Daudon, M., Combes, C., Rey, C., 2012. Characterization and some physicochemical aspects of pathological microcalcifications. *Chem. Rev.* 112, 5092–5120.
- Berkovitch-Yellin, Z., Van Mil, J., Addadi, L., Idelson, M., Lahav, M., Leiserowitz, L., 1985. Crystal morphology engineering by “tailor-made” inhibitors; a new probe to fine intermolecular interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 3111–3122.
- Bischoff, J.L., 1968. Kinetics of calcite nucleation: magnesium ion inhibition and ionic strength catalysis. *J. Geophys. Res.* 73, 3315–3322.
- Black, S.N., Bromley, L.A., Cottier, D., Davey, R.J., Dobbs, B., Rout, J.E., 1991. Interactions at the organic/inorganic interface: binding motifs for phosphonates at the surface of barite crystals. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87, 3409. doi:10.1039/ft9918703409
- Bliznakov, G.M., 1954. Über die Wachstumsformen der Kristalle und den Einfluß der Adsorption auf die lineare Kristallisationsgeschwindigkeit. *Bull Acad Sci Bulg Ser Phy* 4, 135–152.
- Bobtelsky, M., Kertes, S., 1954. The polyphosphates of calcium, strontium, barium and magnesium: Their complex character, composition and behaviour. *J. Appl. Chem.* 4, 419–429. doi:10.1002/jctb.5010040807
- Boistelle, R., 1985. Concepts de la cristallisation en solution. *Actual. Néphrologiques* 159–202.
- Bonucci, E., 2007. *Biological calcification: normal and pathological processes in the early stages*. Springer Science & Business Media.
- Boskey, A.L., 2003. Biom mineralization: an overview. *Connect. Tissue Res.* 44, 5–9.
- Bromley, L.A., 1973. Thermodynamic properties of strong electrolytes in aqueous solutions. *AIChE J.* 19, 313–320.
- Brønsted, J.N., 1922. Studies on solubility. IV. The principle of the specific interaction of ions. *J. Am. Chem. Soc.* 44, 877–898.
- Brown, E.H., Lehr, J.R., Smith, J.P., William Frazier, A., 1963. Preparation and characterization of some calcium pyrophosphates. *J. Agric. Food Chem.* 11, 214–222.
- Cabrera, N., Vermilyea, D.A., 1958. The growth of crystals from solution. *Growth Perfect. Cryst.* 393–410.
- Calvo, C., 1965. The crystal structure and phase transitions of β -Zn₂P₂O₇. *Can. J. Chem.* 43, 1147–1153.

- Campillo-Gimenez, L., Renaudin, F., Gras, P., Rey, C., Combes, C., Cohen-Solal, M., Lioté, F., Ea, H.K., 2016. Mechanisms of calcium pyrophosphate crystal-induced inflammation. Presented at the 50th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation Paris, pp. 8–13.
- Cazalbou, S., Combes, C., Eichert, D., Rey, C., 2004. Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates. *J. Mater. Chem.* 14, 2148–2153.
- Cheng, P., Pritzker, K., 1983. Pyrophosphate, phosphate ion interaction: effects on calcium pyrophosphate and calcium hydroxyapatite crystal formation in aqueous solutions. *J. Rheumatol.* 10, 769–777.
- Cheng, P., Pritzker, K., 1981. The effect of calcium and magnesium ions on calcium pyrophosphate crystal formation in aqueous solutions. *J. Rheumatol.* 8, 772–782.
- Cheng, P., Pritzker, K., Adams, M., Nyburg, S., Omar, S., 1980. Calcium pyrophosphate crystal formation in aqueous solutions. *J. Rheumatol.* 7, 609–616.
- Cheung, H.S., Sallis, J.D., Struve, J.A., 1996. Specific inhibition of basic calcium phosphate and calcium pyrophosphate crystal-induction of metalloproteinase synthesis by phosphocitrate. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1315, 105–111. doi:10.1016/0925-4439(95)00106-9
- Christoffersen, J., 1980. Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite: III. Nucleation-controlled dissolution of a polydisperse sample of crystals. *J. Cryst. Growth* 49, 29–44. doi:10.1016/0022-0248(80)90057-3
- Christoffersen, J., Christoffersen, M.R., 1984. Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 77, 235–242.
- Christoffersen, J., Christoffersen, M.R., Christensen, S.B., Nancollas, G.H., 1983. Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite: VI. The effects of adsorption of methylene diphosphonate, stannous ions and partly-peptized collagen. *J. Cryst. Growth* 62, 254–264.
- Christoffersen, M.R., Balic-Zunic, T., Pehrson, S., Christoffersen, J., 2001. Kinetics of Growth of Columnar Triclinic Calcium Pyrophosphate Dihydrate Crystals. *Cryst. Growth Des.* 1, 463–466.
- Christoffersen, M.R., Balic-Zunic, T., Pehrson, S., Christoffersen, J., 2000. Growth and precipitation of a monoclinic calcium pyrophosphate tetrahydrate indicating auto-inhibition at pH 7. *J. Cryst. Growth* 212, 500–506.
- Christoffersen, M.R., Christoffersen, J., 2003. Effects of a Bisphosphonate (EHDP) on Growth, Formation, and Dissolution of Calcium Pyrophosphate Crystals†. *Cryst. Growth Des.* 3, 79–82.
- Christoffersen, M.R., Seierby, N., Zunic, T.B., Christoffersen, J., 1999. Kinetics of dissolution of triclinic calcium pyrophosphate dihydrate crystals. *J. Cryst. Growth* 203, 234–243.
- Clark, T., 1827. *The Edinburgh Journal of Science*, Royal Society of Edinburgh. ed.
- Clark, T., C., T., 1827a. *The Edinburgh Journal of Science*, Royal Society of Edinburgh. ed.
- Clark, T., C., T., 1827b. *The Edinburgh Journal of Science*, Royal Society of Edinburgh. ed.
- Coe, F.L., Evan, A., Worcester, E., 2005. Kidney stone disease. *J. Clin. Invest.* 115, 2598–2608.
- Combes, C., 1996. Croissance cristalline de phosphates de calcium sur des substrats d'intérêt biologique: le titane et le collagène.
- Combes, C., Rey, C., 2010. Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials. *Acta Biomater.* 6, 3362–3378.
- Combes, C., Rey, C., 2002. Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity. *Biomaterials* 23, 2817–2823. doi:10.1016/S0142-9612(02)00073-X

- Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L., 1994. Cell injury and cellular death. *Robbin's Pathol. Basis Dis.* 5th Ed. Prism Book Pvt Ltd 379–430.
- Davey, R.J., 1976. The effect of impurity adsorption on the kinetics of crystal growth from solution. *J. Cryst. Growth* 34, 109–119. doi:10.1016/0022-0248(76)90268-2
- Davies, C.W., 1962. Ion association. Butterworths.
- De Ricqlès, A., Jacques Livage, 2004. Une introduction a la biomineralisation: diversite et unite. *Comptes Rendus Palevol* 3, 435–441.
- Debye, P., Hückel, E., 1923. De la theorie des electrolytes. I. abaissement du point de congelation et phenomenes associes. *Phys. Z.* 24, 185–206.
- Decision Resources Inc., D.R.I., 2014. Osteoarthritis: Immune and Inflammatory Disorders Study, Decision Resources Inc. ed. Waltham, Massachusetts.
- Dijkgraaf, L.C., Liem, R.S.B., de Bont, L.G.M., Boering, G., 1995. Calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease: a review of the literature and a light and electron microscopic study of a case of the temporomandibular joint with numerous intracellular crystals in the chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 3, 35–45. doi:10.1016/S1063-4584(05)80036-6
- Downey, J.A., Nickel, J.C., Clapham, L., McLEAN, R.J.C., 1992. In vitro Inhibition of Struvite Crystal Growth by Acetohydroxamic Acid. *Br. J. Urol.* 70, 355–359. doi:10.1111/j.1464-410X.1992.tb15787.x
- Effenberger, H., 1990. Structural refinement of low-temperature copper(II) pyrophosphate. *Acta Crystallogr. Sect. C* 46, 691–692. doi:10.1107/S0108270189006463
- Emkey, G., Reginato, A., 2009. All About Gout and Pseudogout: Meeting a Growing Challenge. *J. Musculoskelet. Med.* S17–S23.
- Fleisch, H., Bisaz, S., 1962. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am. J. Physiol. -- Leg. Content* 203, 671–675.
- Fleisch, H.A., Russell, R.G.G., Bisaz, S., Mühlbauer, R.C., Williams, D.A., 1970. The Inhibitory Effect of Phosphonates on the Formation of Calcium Phosphate Crystals in vitro and on Aortic and Kidney Calcification in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.* 1, 12–18. doi:10.1111/j.1365-2362.1970.tb00591.x
- Francis, D.M.D., 1969. The inhibition of calcium hydroxyapatite crystal growth by polyphosphonates and polyphosphates. *Calcif. Tissue Res.* 3, 151–162. doi:10.1007/BF02058658
- Francis, M.D., Graham, R., Russell, G., Fleisch, H., 1969. Diphosphonates Inhibit Formation of Calcium Phosphate Crystals in vitro and Pathological Calcification in vivo. *Science* 165, 1264–1266.
- Fuerst, M., Bertrand, J., Lammers, L., Dreier, R., Echtermeyer, F., Nitschke, Y., Rutsch, F., Schäfer, F.K.W., Niggemeyer, O., Steinhagen, J., Lohmann, C.H., Pap, T., Rüter, W., 2009. Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 2694–2703. doi:10.1002/art.24774
- Fung, B.M., Khitrin, A.K., Ermolaev, K., 2000. An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids. *J. Magn. Reson.* 142, 97–101.
- Garcia, E., 2000. Etude de la dissolution et de la croissance de principes actifs.
- Giachelli, C.M., 1999. Ectopic calcification. *Am. J. Pathol.* 154, 671–675.
- Gibbs, J.W., 1948. *The Collected Works of J. Willard Gibbs: Thermodynamics.* Yale University Press.
- Giesber, H.G., Korzenski, M.B., Pennington, W.T., Kolis, J.W., 2000. Fe₂P₂O₇ (H₂O) 2. *Acta Crystallogr. C* 56, 399–400.
- Glass, J., Grahame, R., 1976. Chondrocalcinosis after parathyroidectomy. *Ann. Rheum. Dis.* 35, 521–525.

- Gránásy, L., Pusztai, T., Tegze, G., Warren, J.A., Douglas, J.F., 2005. Growth and form of spherulites. *Phys. Rev. E* 72, 011605. doi:10.1103/PhysRevE.72.011605
- Gras, P., 2014. Etude physico-chimique et structurale de pyrophosphates de calcium hydratés : application aux micro-calcifications associées à l'arthrose (phd).
- Gras, P., Baker, A., Combes, C., Rey, C., Sarda, S., Wright, A.J., Smith, M.E., Hanna, J.V., Gervais, C., Laurencin, D., Bonhomme, C., 2016a. From crystalline to amorphous calcium pyrophosphates: A solid state Nuclear Magnetic Resonance perspective. *Acta Biomater.* 31, 348–357.
- Gras, P., Rey, C., André, G., Charvillat, C., Sarda, S., Combes, C., 2016b. Crystal structure of monoclinic calcium pyrophosphate dihydrate (m-CPPD) involved in inflammatory reactions and osteoarthritis. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* 72, 96–101.
- Gras, P., Rey, C., Marsan, O., Sarda, S., Combes, C., 2013a. Synthesis and Characterisation of Hydrated Calcium Pyrophosphate Phases of Biological Interest. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2013, 5886–5895.
- Gras, P., Teychené, S., Rey, C., Charvillat, C., Biscans, B., Sarda, S., Combes, C., 2013b. Crystallisation of a highly metastable hydrated calcium pyrophosphate phase. *CrystEngComm* 15, 2294.
- Grimmer, A.R., von Lampe, F., Mägi, M., Lippmaa, E., 1983. Solid state high resolution silicon-29 NMR of silicates; effect of iron (2+) in olivines. *Z Chem* 23, 343–344.
- Grover, L.M., Wright, A.J., Gbureck, U., Bolarinwa, A., Song, J., Liu, Y., Farrar, D.F., Howling, G., Rose, J., Barralet, J.E., 2013. The effect of amorphous pyrophosphate on calcium phosphate cement resorption and bone generation. *Biomaterials* 34, 6631–6637.
- Guggenheim, E.A., Turgeon, J.C., 1955. Specific interaction of ions. *Trans. Faraday Soc.* 51, 747–761.
- Guillemin, F., Rat, A.C., Mazieres, B., Pouchot, J., Fautrel, B., Euller-Ziegler, L., Fardellone, P., Morvan, J., Roux, C.H., Verrouil, E., Saraux, A., Coste, J., 2011. Prevalence of symptomatic hip and knee osteoarthritis: a two-phase population-based survey1. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1314–1322.
- Gutjahr, A., Dabringhaus, H., Lacmann, R., 1996. Studies of the growth and dissolution kinetics of the CaCO₃ polymorphs calcite and aragonite II. The influence of divalent cation additives on the growth and dissolution rates. *J. Cryst. Growth* 158, 310–315.
- Haidinger, W., H.W., 1827. *The Edinburgh Journal of Science*, Royal Society of Edinburgh. ed.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* 8, 89–193.
- Hayashi, S., Ueda, T., Hayamizu, K., Akiba, E., 1992. NMR study of kaolinite. 2. Proton, aluminum-27, and silicon-29 spin-lattice relaxations. *J. Phys. Chem.* 96, 10928–10933.
- Hill, R.J., Howard, C.J., 1987. Quantitative phase analysis from neutron powder diffraction data using the Rietveld method. *J. Appl. Crystallogr.* 20, 467–474. doi:10.1107/S0021889887086199
- Hillig, W.B., 1966. A derivation of classical two-dimensional nucleation kinetics and the associated crystal growth laws. *Acta Metall.* 14, 1868–1869.
- Humphreys-Owen, S.P.F., 1949. Crystal Growth from Solution. *Proc. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* 197, 218–237. doi:10.1098/rspa.1949.0060
- Jacobs, A., Miller, F., Worwood, M., Beamish, M.R., Wardrop, C.A., 1972. Ferritin in the Serum of Normal Subjects and Patients with Iron Deficiency and Iron Overload. *Br Med J* 4, 206–208. doi:10.1136/bmj.4.5834.206

- Jebens, E.H., Monk-Jones, M.E., 1959. ON THE VISCOSITY AND pH OF SYNOVIAL FLUID AND THE. *blood* 20, 58.
- Jones, A.C., Chuck, A.J., Arie, E.A., Green, D.J., Doherty, M., 1992. Diseases associated with calcium pyrophosphate deposition disease. *Semin. Arthritis Rheum.* 22, 188–202. doi:10.1016/0049-0172(92)90019-A
- Jw, W., Pg, W., Lh, S., 1985. Inhibitors of crystal growth of hydroxyapatite: a constant composition approach. *J. Urol.* 134, 1255–1258.
- Kazmierczak, T.F., Tomson, M.B., Nancollas, G.H., 1982. Crystal growth of calcium carbonate. A controlled composition kinetic study. *J. Phys. Chem.* 86, 103–107. doi:10.1021/j100390a020
- Kern, R., 1968. Croissance cristalline et adsorption. *Bull Soc Fr Miner. Cristal.* 91, 247.
- Kohn, N.N., Hughes, R.E., Mccarty, J., Faires, J.S., 1962. The Significance of Calcium Phosphate Crystals in the Synovial Fluid of Arthritic Patients: The “Pseudogout Syndrome”II. Identification of Crystals. *Ann. Intern. Med.* 56, 738–745.
- Königsberger, E., Königsberger, L., 2006. *Biomineralization: Medical aspects of solubility.* Wiley Online Library.
- Koo, S., König, B., Allegrini, S., Yoshimoto, M., Carbonari, M.J., Mitri-Luiz, F.F., 2006. Titanium implant osseointegration with calcium pyrophosphate in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 76, 373–380.
- Koutsoukos, P., Amjad, Z., Tomson, M.B., Nancollas, G.H., 1980. Crystallization of calcium phosphates. A constant composition study. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 1553–1557. doi:10.1021/ja00525a015
- Kuettner, K., Goldberg, V., 1994. American Academy of Orthopædic Surgeons Symposium. In *Osteoarthritis Disorders.* AAOS publishers, Rosemont.
- Lee, J.H., Chang, B.-S., Jeung, U.-O., Park, K.-W., Kim, M.-S., Lee, C.-K., 2011. The first clinical trial of beta-calcium pyrophosphate as a novel bone graft extender in instrumented posterolateral lumbar fusion. *Clin. Orthop. Surg.* 3, 238–244.
- Li, J.-J., Zhu, C.-G., Yu, B., Liu, Y.-X., Yu, M.-Y., 2007. The role of inflammation in coronary artery calcification. *Ageing Res. Rev.* 6, 263–270.
- Lindeman, R.D., Clark, M.L., Colmore, J.P., 1971. Influence of Age and Sex on Plasma and Red-Cell Zinc Concentrations. *J. Gerontol.* 26, 358–363. doi:10.1093/geronj/26.3.358
- Liu, Y.Z., Jackson, A.P., Cosgrove, S.D., 2009. Contribution of calcium-containing crystals to cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 1333–1340. doi:10.1016/j.joca.2009.04.022
- Lowenstam, H.A., 1986. Mineralization processes in monerans and protoctists. *Biominer. Low. Plants Anim.* 30, 1–17.
- Lowenstam, H.A., 1981. Minerals formed by organisms. *Science* 211, 1126–1131.
- Lowenstam, H.A., Weiner, S., 1989. *On biomineralization.* Oxford University Press on Demand.
- Lynch, L.A.M., Dunican, D.K.C., Seed, S.S.M., 2009. Osteoarthritis: a review of treatment options. *Formulary* 44, 143–152.
- MacMullan, P., McMahon, G., McCarthy, G., 2011. Détection des cristaux de phosphate de calcium basique dans l’arthrose. *Rev. Rhum.* 78, 220–226. doi:10.1016/j.rhum.2011.02.003
- Madsen, I.C., Scarlett, N.V.Y., Kern, A., 2011. Description and survey of methodologies for the determination of amorphous content via X-ray powder diffraction. *Z. Für Krist. Cryst. Mater.* 226, 944–955.
- Mandel, G.S., Renne, K.M., Kolbach, A.M., Kaplan, W.D., Miller, J.D., Mandel, N.S., 1988. Calcium pyrophosphate crystal deposition disease: Preparation and characterization of crystals. *J. Cryst. Growth* 87, 453–462.

- Mandel, N.S., 1975. The crystal structure of calcium pyrophosphate dihydrate. *Acta Crystallogr. B* 31, 1730–1734. doi:10.1107/S0567740875005997
- Mann, S., 1996. *Biomimetic Materials Chemistry*. VCH N. Y.
- McCarty, D.J., Solomon, S.D., Warnock, M.L., Paloyan, E., 1971. Inorganic pyrophosphate concentrations in the synovial fluid of arthritic patients. *J. Lab. Clin. Med.* 78, 216–229.
- McCarty, J., Kohn, N.N., Faires, J.S., 1962. The Significance of Calcium Phosphate Crystals in the Synovial Fluid of Arthritic Patients: The “Pseudogout Syndrome” I. *Clinical Aspects. Ann. Intern. Med.* 56, 711–737.
- McCarty, R.J., Stebbins, J.F., 2016. Transition Metal Dopant Cation Distributions in MgO and CaO: New Inferences from Paramagnetically Shifted Resonances in ^{17}O , ^{25}Mg , and ^{43}Ca NMR Spectra. *J. Phys. Chem. C* 120, 11111–11120.
- McCartyJR., D.J., Hogan, J.M., Gatter, R.A., Grossman, M., 1966. Studies on Pathological Calcifications in Human Cartilage I. Prevalence and types of crystal deposits in the menisci of two hundred fifteen cadavera. *J. Bone Jt. Surg.* 48, 309–325.
- McClure, J., Smith, P.S., 1983. Calcium pyrophosphate dihydrate deposition in the intervertebral discs in a case of Wilson’s disease. *J. Clin. Pathol.* 36, 764–768. doi:10.1136/jcp.36.7.764
- Mullin, J.W., 2001. *Crystallization*. Butterworth-Heinemann, Oxford; Boston.
- Myerson, A., 2002. *Handbook of Industrial Crystallization*. Butterworth-Heinemann.
- Naga, S.M., Awaad, M., El-Maghraby, H.F., El-Kady, A.M., 2014. Biological Performance of Calcium Pyrophosphate-coated Porous Alumina Scaffolds. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 11, 1–11.
- Nair, D., Misra, R.P., Sallis, J.D., Cheung, H.S., 1997. Phosphocitrate inhibits a basic calcium phosphate and calcium pyrophosphate dihydrate crystal-induced mitogen-activated protein kinase cascade signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 18920–18925.
- Nancollas, G.H., Purdie, N., 1964. The kinetics of crystal growth. *Q. Rev. Chem. Soc.* 18, 1–20.
- Nancollas, G.H., Zawacki, S.J., 1989. Calcium Phosphate Mineralization. *Connect. Tissue Res.* 21, 239–246. doi:10.3109/03008208909050013
- Nielsen, A.E., 1984. Electrolyte crystal growth mechanisms. *J. Cryst. Growth* 67, 289–310. doi:10.1016/0022-0248(84)90189-1
- Nyvlt, J., Ulrich, J., 2008. *Admixtures in Crystallization*. John Wiley & Sons.
- Oka, J., Kawahara, A., 1982. The structure of synthetic dimagnesium diphosphate(V) dihydrate. *Acta Crystallogr. B* 38, 3–5. doi:10.1107/S0567740882001927
- Oldfield, E., Kinsey, R.A., Smith, K.A., Nichols, J.A., Kirkpatrick, R.J., 1983. High-resolution NMR of inorganic solids. Influence of magnetic centers on magic-angle sample-spinning lineshapes in some natural aluminosilicates. *J. Magn. Reson.* 1969 51, 325–329.
- O’rourke, J.D., Johnson, R.A., 1955. Kinetics and mechanism in formation of slightly soluble ionic precipitates. *Anal. Chem.* 27, 1699–1704.
- Oyane, A., Kim, H.-M., Furuya, T., Kokubo, T., Miyazaki, T., Nakamura, T., 2003. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *J. Biomed. Mater. Res. A* 65A, 188–195.
- Pitzer, K.S., 1991. Ion interaction approach: theory and data correlation. *Act. Coeff. Electrolyte Solut.* 2, 75–153.
- Pitzer, K.S., 1973. Thermodynamics of electrolytes. I. Theoretical basis and general equations. *J. Phys. Chem.* 77, 268–277. doi:10.1021/j100621a026
- Price, P.A., Faus, S.A., Williamson, M.K., 2001. Bisphosphonates Alendronate and Ibandronate Inhibit Artery Calcification at Doses Comparable to Those That Inhibit

- Bone Resorption. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 817–824. doi:10.1161/01.ATV.21.5.817
- Pritzker, K.P.H., 1998. *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*, Kluwer Academic Publishers. ed. Springer Science & Business Media, Boston.
- Ramos, Y.F., Bos, S.D., van der Breggen, R., Kloppenburg, M., Ye, K., Lameijer, E.-W.E., Nelissen, R.G., Slagboom, P.E., Meulenbelt, I., 2015. A gain of function mutation in TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes osteoarthritis with chondrocalcinosis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 1756–1762.
- Reddy, M.M., Nancollas, G.H., 1976. The crystallization of calcium carbonate: IV. The effect of magnesium, strontium and sulfate ions. *J. Cryst. Growth* 35, 33–38.
- Richette, P., Bardin, T., 2011. Chondrocalcinose Calcium pyrophosphate deposition disease. *Presse Médicale, Arthropathies microcristallines* 40, 856–864. doi:10.1016/j.lpm.2011.03.015
- Roch-Arveiller, M., Legros, R., Chanaud, B., Muntaner, O., Strzalko, S., Thuret, A., Willoughby, D., Giroud, J., 1990. Inflammatory reactions induced by various calcium pyrophosphate crystals. *Biomed. Pharmacother.* 44, 467–474. doi:10.1016/0753-3322(90)90207-P
- Rondeau, J.-M., Bitsch, F., Bourgier, E., Geiser, M., Hemmig, R., Kroemer, M., Lehmann, S., Ramage, P., Rieffel, S., Strauss, A., Green, J.R., Jahnke, W., 2006. Structural Basis for the Exceptional in vivo Efficacy of Bisphosphonate Drugs. *ChemMedChem* 1, 267–273. doi:10.1002/cmdc.200500059
- Rosenthal, A.K., Gohr, C.M., Uzuki, M., Masuda, I., 2007. Osteopontin promotes pathologic mineralization in articular cartilage. *Matrix Biol.* 26, 96–105.
- Russell, R.G.G., Rogers, M.J., 1999. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 25, 97–106.
- Sakamoto, H., 1995. The solubility of calcium pyrophosphate dihydrate crystals. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 69, 484–492.
- Sarver, L.A., Brinton, P.H.M.-P., 1927. The solubilities of some rare-earth oxalates. *J. Am. Chem. Soc.* 49, 943–958. doi:10.1021/ja01403a006
- Scarlett, N.V.Y., Madsen, I.C., 2006. Quantification of phases with partial or no known crystal structures. *Powder Diffr.* 21, 278–284.
- Schierholtz, O.J., 1958. The Crystallization of Calcium Sulphate Dihydrate. *Can. J. Chem.* 36, 1057–1063. doi:10.1139/v58-152
- Seyssiecq, I., Veesler, S., Pepe, G., Boistelle, R., 1999. The influence of additives on the crystal habit of gibbsite. *J. Cryst. Growth* 196, 174–180.
- Sherriff, B.L., Hartman, J.S., 1985. Solid-state high-resolution ²⁹Si NMR of feldspars; Al-Si disorder and the effects of paramagnetic centres. *Can. Mineral.* 23, 205–212.
- Shimamura, K., Ueno, S., Miyamoto, Y., Sato, K., 2013. Effects of Polyglycerine Fatty Acid Esters Having Different Fatty Acid Moieties on Crystallization of Palm Stearin. *Cryst. Growth Des.* 13, 4746–4754. doi:10.1021/cg400910g
- Shinozaki, T., Pritzker, K.P., 1996. Regulation of alkaline phosphatase: implications for calcium pyrophosphate dihydrate crystal dissolution and other alkaline phosphatase functions. *J. Rheumatol.* 23, 677–683.
- Shinozaki, T., Pritzker, K.P., 1995. Polyamines enhance calcium pyrophosphate dihydrate crystal dissolution. *J. Rheumatol.* 22, 1907–1912.
- Shinozaki, T., Xu, Y., Cruz, T.F., Pritzker, K.P., 1995. Calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystal dissolution by alkaline phosphatase: interaction of alkaline phosphatase on CPPD crystals. *J. Rheumatol.* 22, 117–123.
- Shroff, R.C., Shah, V., Hiorns, M.P., Schoppet, M., Hofbauer, L.C., Hawa, G., Schurgers, L.J., Singhal, A., Merryweather, I., Brogan, P., Shanahan, C., Deanfield, J., Rees, L.,

2008. The circulating calcification inhibitors, fetuin-A and osteoprotegerin, but not matrix Gla protein, are associated with vascular stiffness and calcification in children on dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 23, 3263–3271. doi:10.1093/ndt/gfn226
- Slater, C., Laurencin, D., Burnell, V., Smith, M.E., Grover, L.M., Hriljac, J.A., Wright, A.J., 2011. Enhanced stability and local structure in biologically relevant amorphous materials containing pyrophosphate. *J. Mater. Chem.* 21, 18783–18791.
- Söhnle, O., Garside, J., 1992. *Precipitation: basic principles and industrial applications.* Butterworth-Heinemann, Oxford; Boston.
- Somrani, S., Rey, C., Jemal, M., 2003. Thermal evolution of amorphous tricalcium phosphate. *J. Mater. Chem.* 13, 888–892.
- Souhassou, M., Lecomte, C., Blessing, R.H., 1992. Crystal chemistry of $Mg_2P_2O_7 \cdot nH_2O$, $n = 0, 2$ and 6 : magnesium-oxygen coordination and pyrophosphate ligation and conformation. *Acta Crystallogr. B* 48, 370–376.
- Swan, A., Heywood, B., Chapman, B., Seward, H., Dieppe, P., 1995. Evidence for a causal relationship between the structure, size, and load of calcium pyrophosphate dihydrate crystals, and attacks of pseudogout. *Ann. Rheum. Dis.* 54, 825–830.
- Tang, R., Henneman, Z.J., Nancollas, G.H., 2003. Constant composition kinetics study of carbonated apatite dissolution. *J. Cryst. Growth* 249, 614–624. doi:10.1016/S0022-0248(02)02332-1
- Taulelle, P., 2007. *Etude de l'influence d'ajout d'additifs lors de la cristallisation de molécules pharmaceutiques (Theses).* Université de droit, d'économie et des sciences - Aix-Marseille III.
- Tomson, M.B., Nancollas, G.H., 1978. Mineralization Kinetics: A Constant Composition Approach. *Science* 200, 1059–1060. doi:10.1126/science.200.4345.1059
- Troost, S., 1968. Influence of surface-active agents on the crystal growth of sodium triphosphate hexahydrate. *J. Cryst. Growth* 3–4, 340–343. doi:10.1016/0022-0248(68)90171-1
- Van Wazer, J.R., Callis, C.F., 1958. Metal complexing by phosphates. *Chem. Rev.* 58, 1011–1046.
- Verron, E., Gauthier, O., Janvier, P., Pilet, P., Lesoeur, J., Bujoli, B., Guicheux, J., Bouler, J.-M., 2010. In vivo bone augmentation in an osteoporotic environment using bisphosphonate-loaded calcium deficient apatite. *Biomaterials* 31, 7776–7784. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.06.047
- Vicum, L., Ottiger, S., Mazzotti, M., Makowski, Ł., Bałdyga, J., 2004. Multi-scale modeling of a reactive mixing process in a semibatch stirred tank. *Chem. Eng. Sci., Complex Systems and Multi-scale Methodology* 59, 1767–1781. doi:10.1016/j.ces.2004.01.032
- Walters, G.O., Miller, F.M., Worwood, M., 1973. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. *J. Clin. Pathol.* 26, 770–772. doi:10.1136/jcp.26.10.770
- Weiner, S., Dove, P.M., 2003. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Rev. Mineral. Geochem.* 54, 1–29.
- Weissbuch, I., Lahav, M., Leiserowitz, L., 2003. Toward stereochemical control, monitoring, and understanding of crystal nucleation. *Cryst. Growth Des.* 3, 125–150.
- Williams, C.J., Pendleton, A., Bonavita, G., Reginato, A.J., Hughes, A.E., Peariso, S., Doherty, M., McCarty, D.J., Ryan, L.M., 2003. Mutations in the amino terminus of ANKH in two US families with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. *Arthritis Rheum.* 48, 2627–2631.
- Williams Jr, J.C., 2009. *Unlock the mysteries of stone analysis.* WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA.

- Yajnik, C.S., Smith, R.F., Hockaday, T.D., Ward, N.I., 1984. Fasting plasma magnesium concentrations and glucose disposal in diabetes. *Br Med J Clin Res Ed* 288, 1032–1034.
- Zbaida, D., Lahav, M., Drauz, K., Knaup, G., Kottenhahn, M., 2000. A Cyclic Continuous Process for Converting Conglomerates into Optically Pure Enantiomers by Crystallization and Dissolution with the Assistance of “Tailor-Made” Polymers. *Tetrahedron* 56, 6645–6649.
- Zhang, W., Doherty, M., Pascual, E., Barskova, V., Guerne, P.-A., Jansen, T.L., Leeb, B.F., Perez-Ruiz, F., Pimentao, J., Punzi, L., 2011. EULAR recommendations for calcium pyrophosphate deposition. Part II: management. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 571–575.
- Žitňan, D., Sit’Aj, Š., 1963. Chondrocalcinosis articularis: section I. Clinical and radiological study. *Ann. Rheum. Dis.* 22, 142.

Annexes

Annexe 1-Description des différentes techniques d'analyses physico-chimiques utilisées

1 - Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X (DRX) est une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X par la matière. Le phénomène de diffraction n'ayant lieu qu'avec la matière cristalline, on parle de diffusion pour les matériaux non-cristallins. Cette méthode utilise un faisceau de rayons X qui interagit le cristal provoquant la dispersion du faisceau lumineux dans des directions spécifiques. Par la mesure des angles et de l'intensité des rayons réfractés, il est possible d'obtenir une image tridimensionnelle de la densité électronique dans le cristal. À partir de cette densité, la position moyenne des atomes du cristal peut être déterminée.

Les données de diffraction des rayons X de poudres présentées dans ce manuscrit ont été recueillies à l'aide d'un diffractomètre Bruker D8 Advance équipé de la géométrie de Bragg-Brentano θ - θ et d'une anode de cuivre (λ (Cu $K_{\alpha 1}$) = 1,54060 Å et λ (Cu $K_{\alpha 2}$) = 1,54439 Å). Les diagrammes de diffraction des rayons X ont été obtenus pour une gamme d'angles 2θ variant de 5 à 50 ° avec un pas de 0,2 °.

2 - Méthodes Spectroscopiques

2-1 - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons des groupements constituant le composé et d'identifier les fonctions chimiques présentes. Les mesures par transformée de Fourier des absorbances permettent d'en effectuer l'analyse à partir d'une quantité de poudre très faible. On accède ainsi directement à la composition moléculaire des matériaux analysés. Cette méthode fournit donc un moyen efficace pour clairement identifier les pyrophosphates de calcium hydratés.

Les analyses par spectroscopie infrarouge présentées dans ce manuscrit ont été réalisées avec un spectrophotomètre à transformée de Fourier ThermoNicolet 5700 dans la gamme

4000-400 cm^{-1} avec 64 accumulation de scan en mode transmission avec une résolution de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ en utilisant des échantillons de poudre mis sous forme de pastilles après mélange avec une quantité de KBr (2 mg d'échantillon dans 300 mg de KBr).

2-2 - Spectroscopie Raman

La spectrométrie Raman repose sur le principe de la diffusion inélastique de la lumière par un milieu. Quelques photons incidents échangent de l'énergie avec le milieu, ce qui engendre un changement de fréquence d'une partie de la lumière diffusée par rapport à celle incidente. Un spectre Raman fournit donc une empreinte des liaisons présentes dans l'échantillon. Il permet d'obtenir des informations à la fois qualitatives et quantitatives sur le milieu étudié. Ainsi, on peut déterminer la composition du matériau grâce à la position des bandes visibles sur le spectre Raman et leur intensité nous renseigne sur la concentration des constituants du matériau.

Spectroscopie IR et Raman sont complémentaires et permettent de caractériser une molécule/un groupe ionique dans son ensemble car les bandes vibration peu visible en spectroscopie RAMAN sont généralement bien visible en spectroscopie IR et vice-versa. En général un pic intense en Raman le sera moins en IR et vice versa. L'utilisation de ces deux techniques en parallèle permet donc d'étudier avec précision la structure complète d'une molécule.

Les acquisitions de spectre Raman ont été réalisées à l'aide d'un microspectromètre confocal Horiba Jobin Yvon Labram HR800 équipé d'une diode laser Ar ($\lambda = 532 \text{ nm}$) sur un domaine spectral s'étendant de 50 à 4000 cm^{-1} avec un temps d'acquisition de 10 secondes et 4 accumulations pour les phases cristallines et amorphe. Le montage optique est composé d'un réseau de 600 traits/mm, d'un objectif x100, d'un diaphragme 100 μm sans utilisation de filtre.

L'attribution des bandes de vibration associées aux différentes liaisons présentes dans un cristal de CPP sont reportées dans le Tableau 1-1 et affinés par Pierre Gras (Gras, 2014) seront utilisés comme référence et en complément des analyses par diffraction des rayons X afin d'identifier les phases synthétisées par précipitation en présence ou non d'additifs au cours de cette thèse.

Tableau 1-1 - Position et attribution des bandes de vibration FTIR et Raman (cm^{-1}), pour les phases cristallisées *m*-CPPD, *t*-CPPD et *m*-CPPT β (Gras et al., 2013a).

t-CPPD		m-CPPT β		m-CPPD		Assignment
IR	Raman	IR	Raman	IR	Raman	
3576	3578	3615		3521	3525	
3511	3511	3551	3547	3476	3476	
3471	3464	3488		3366	3368	
3361	3368	3364	3386	3309		V _{OH}
3305	3300	3263	3242	3249	3251	
3244	3242	3178	3168	3188	3193	
3182	3182	3047	3050			
1711		1662	1664	1669	1665	
1660		1620		1636	1628	δ_{HOH}
1522						
1195	1182	1193		1206		
1140	1121	1159	1147	1165	1147	V ^{as} _{PO3}
1130	1113	1120	1128	1134	1131	
1088	1080	1094	1101	1121	1106	
			1079	1078	1076	
1037	1049	1035	1036	1036	1045	V ^s _{PO3}
990	990	1007	1008	991	992	V ^{as} _{PO3}
920	916	957	945	934	941	V ^{as} _{POP}
880	890	934				
798	797			802		H ₂ O libration
762	753	736	743	767	775	
				739	725	V ^s _{POP}
696	705			691		H ₂ O libration
621	618	621	597	625	611	
594	590	576	573	589	579	
569	557	561	562	569	571	
534	533	549	547	509	518	$\delta_{\text{PO3}} + \rho_{\text{PO3}}$
507	512	513	518	442	433	
493	493	488	479			
438	436	440				

2-3 - Résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide

Les spectres RMN MAS (magic-angle spinning) du ^{31}P ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AVANCE III équipé avec une sonde 700 MHz de 4 mm. Les données ont été enregistrées à 700 MHz, la fréquence MAS utilisé était de 14 Hz.

Les déplacements chimiques ont été référencés par rapport à H_3PO_4 . Dans le cadre de ces travaux de thèse sur l'étude de l'effet d'additifs ioniques sur la précipitation de pyrophosphates de calcium hydratés, les principaux objectifs de ces expériences ont été (i) de mesurer les temps de relaxation $T_1(^{31}\text{P})$ afin d'évaluer l'impact des cations ajoutés dans le milieu de précipitation, et (ii) d'enregistrer des spectres RMN ^{31}P complètement relaxés afin d'obtenir la quantification les phases concernées. En bref, une expérience de retour de saturation sous MAS rapide a été mis en œuvre de la manière suivante : des impulsions de saturation de ^{31}P ont été suivies par un délai allant de 0,25 s à 720 s, et une impulsion finale ^{31}P de 90° durant 5 ms. Un découplage du ^1H Spinal-64 (70 kHz) a été appliqué pendant les acquisitions (Fung et al., 2000). Avant toutes les expériences, l'angle magique a été soigneusement réglé afin d'obtenir la meilleure résolution de ^{31}P MAS, en évitant la réintroduction de l'anisotropie de déplacement chimique ou l'interaction dipolaire qui élargirait les spectres. Quatre balayages ont généralement été utilisés.

3 - Méthodes par microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Cette méthode a permis d'identifier les morphologies des différentes phases de CPP dont il est question dans cette thèse.

Les micrographies MEB ont été obtenues en utilisant un microscope Leo 435 VP. Les échantillons pulvérulent et prélèvements de ménisques arthrosiques ont été disposés sur un scotch double face recouvrant la surface d'un plot en aluminium et métallisés à l'argent à l'aide d'un évaporateur (Scancoat Six, Edwards) avant observation.

4 - Analyses chimiques par spectrométrie d'émission à plasma induit ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry)

Les analyses chimiques élémentaires pour quantifier les éléments présents dans les échantillons présentés au chapitre II ont été effectuées à partir de solutions aqueuses des échantillons dissous en utilisant la spectrométrie d'émission à plasma induit (ICP-OES, spectromètreUltima2, HORIBA Jobin Yvon). Chaque échantillon a été analysé trois fois.

Cette technique de quantification est basée sur l'analyse par spectrométrie d'émission optique de photons générés par un plasma à couplage inductif. La méthode consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon, ou parfois d'hélium. Les liaisons entre les atomes de la matière à analyser sont alors cassées. Les électrons des atomes excités (ionisés), lorsqu'ils retournent à l'état fondamental, émettent un photon dont l'énergie et la longueur d'onde sont caractéristiques de l'élément. La lumière émise par le plasma est alors analysée par un ou plusieurs monochromateurs. Cette analyse permet de déterminer la quantité de chaque ion présent dans l'échantillon. La limite de détection de cette technique est de l'ordre du $\mu\text{g/L}$.

5 - Autre analyses

Analyses thermogravimétriques (ATG)

Les analyses thermogravimétriques ont été effectuées en utilisant le système Setaram Instrumentation Setsys Evolution avec une rampe de température de 5°C par minute pour des températures allant de 25°C à 1000°C .

Mesure de surfaces spécifiques par la méthode BET

La surface spécifique des échantillons de référence notamment ceux utilisés comme semences au chapitre III a été évaluée par la méthode Brunauer–Emmett–Teller (BET) (adsorption d'azote) à l'aide d'un appareil Quantachrome Instruments Monosorb Nova 1000. L'erreur relative est estimée à $0.5\text{ m}^2/\text{g}$.

Annexe 2- Description de la méthode PONKCS (Partial or No Known Crystal Structure Method) pour la quantification de phase amorphe parmi d'autres phases cristallisées en DRX

Une étude semi-quantitative a été réalisée à partir des données de diffraction des rayons X obtenues pour chaque échantillon synthétisé au chapitre II à l'aide du logiciel TOPAS et selon les méthodes de Scarlett et Madsen (Scarlett and Madsen, 2006) et Madsen *et al.* (Madsen et al., 2011). La méthode nommée « Partial or No Known Crystal Structure Method » (PONKCS) a permis la détermination de la proportion relative massique (%) des phases m-CPPD, t-CPPD et a-CPP composant les poudres étudiées. Il s'agit d'une approche directe, où la contribution de l'amorphe dans le diffractogramme RX est utilisée pour directement estimer sa proportion. La précision sur les pourcentages massiques des proportions relatives estimées par la méthode PONKCS est de $\pm 1\%$. (Madsen et al., 2011).

Nous avons donc déterminé avec cette méthode le rapport entre les phases m-CPPD et t-CPPD (méthode Rietveld) et a-CPP estimé par comparaison au fond continu supposé constant d'un échantillon à l'autre. L'aire du fond continu a ainsi été traitée par la méthode PONKCS comme une phase amorphe quelconque ayant la densité d'un pyrophosphate de calcium hydraté. Cette identification permet l'attribution d'un rapport entre phase amorphe et phase cristallisée. Le rapport entre les aires des phases cristallines, telles que obtenues par la méthode Rietveld, et l'aire totale du fond continu renvoie ainsi à la quantité de phase cristalline diluée dans l'échantillon amorphe. La fraction W_α de chaque phase présente dans l'échantillon est estimée d'après l'algorithme de Hill et Howard (Hill and Howard, 1987) :

$$W_\alpha = \frac{S_\alpha (ZMV)_\alpha}{\sum_{j=1}^n S_j (ZMV)_j} \quad (2-1)$$

Avec S_α le facteur d'échelle de Rietveld de la phase α , ZM la masse des composants de la maille, V le volume de la maille et n le nombre de phases présentes dans l'échantillon. La phase amorphe ne possédant par définition pas de maille le ZMV de cette phase peut être dérivé empiriquement par l'intermédiaire d'un mélange connue de phase amorphe et d'une

phase standard s dont le ZMV_s est connu. ZMV_a se détermine alors d'après l'équation suivante :

$$ZMV_{amorphe} = \frac{W_{amorphe}}{W_s} \times \frac{S_s}{S_{amorphe}} \quad (2-2)$$

Où $W_{amorphe}$ et W_s sont les fractions massiques connues des deux phases constituant l'échantillon et $S_{amorphe}$ et S_s sont les facteurs d'échelle affinés pour les phases respectives amorphe et standard. Cependant dans le cas des CPP il n'a pas été nécessaire de déterminer le ZMV de l'a-CPP de manière empirique et selon l'équation (2-2) car nous connaissons sa composition et donc sa masse molaire qui n'évolue pas ($Ca_2P_2O_7 \cdot nH_2O$; $3,8 < n < 4,2$; $n = 4$ a été pris en compte pour les calculs).

Annexe 3- Détermination des concentrations des solutions utilisées pour la croissance cristalline à composition constante

Les solutions réalisées doivent avoir une composition permettant de maintenir constante la valeur de chaque concentration en ions dans la solution sursaturée métastable de travail et donc par la même occasion sa force ionique et son pH.

***Définition des variables c'est-à-dire des concentrations des espèces ioniques dans les solutions de travail et titrantes**

	Solution de travail	Solutions titrantes
[Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O]	x_1	y_1
[K ₄ P ₂ O ₇]	x_2	y_2
[HNO ₃]	x_3	y_3
[KNO ₃]	x_4	y_4

***Calcul des concentrations des deux solutions titrantes dans le cas de la croissance de CPP, $(Ca/P)_{sol.} = 1$:**

Le maintien constant des concentrations en ions dans la solution de travail se traduit de la manière suivante :

- pour les ions calcium

$$x_1 = \frac{(x_1 v + y_1 dv - dm)}{v + 2dv} \quad (3-1)$$

où v est le volume initial de la solution de travail, dv le volume de solution titrante ajoutée par chaque titrateur et dm le nombre de moles de CPP précipitées.

L'équation (3-1) peut également s'écrire :

$$y_1 = 2x_1 + \frac{dm}{dv} \quad (3-2)$$

On pose alors $\frac{dm}{dv} = Cx_1$, tel que la valeur Cx_1 représente le nombre de moles de CPP précipitées par litre de chaque solution titrante. On appelle cette valeur la concentration effective de la solution titrante. C est un paramètre expérimental et choisi de façon à ce que la compensation (remplacement) des ions consommés par la croissance de CPP ne soit ni trop lente ni trop rapide. Par convention C est choisi tel que :

$$1,5 < C < 10$$

Expérimentalement le maintien du pH à sa valeur de consigne de départ (à $\pm 0,01$ unité pH) indique que la valeur de C utilisée est correcte. Dans le cas contraire une diminution ou une augmentation du pH trop importante malgré plusieurs ou un seul ajout de titrant indique que la valeur de C choisie est respectivement trop faible ou trop élevée.

L'équation (3-2) devient alors :

$$y_1 = 2x_1 + Cx_1 \quad (3-3)$$

Pour les ions pyrophosphate le même raisonnement conduit à l'obtention de l'équation :

$$y_2 = 2x_2 + \frac{1}{2}Cx_1 \quad (3-4)$$

La concentration effective (Cx_1) des solutions titrantes apporte non seulement la quantité d'ions Ca^{2+} et $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ supplémentaires, nécessaire au maintien constant de leur concentration dans la solution de travail compensant leur consommation pour la formation de CPP, mais aussi des ions NO_3^- et K^+ supplémentaires. Ainsi, la concentration de ces derniers ions varient également dans le milieu. Pour parvenir à maintenir les concentrations de ces ions constantes on ajoute dans la solution de travail une quantité de matière x_4v de KNO_3 telle que les équations suivantes soient respectées :

-cas du maintien de la concentration en NO_3^- apportés par $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, HNO_3 et KNO_3 :

$$2x_1 + x_3 + x_4 = \frac{(2x_1v + x_3v + x_4v + 2y_1dv + y_32dv)}{v + 2dv} \quad (3-5)$$

$$\text{soit, } y_1 + y_3 = 2x_1 + x_3 + x_4 \quad (3-6)$$

-cas du maintien de la concentration en K^+ apportés par $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ et KNO_3 :

$$4x_2 + x_4 = \frac{(4x_2v + x_4v + 4y_2dv + y_4dv)}{v + 2dv} \quad (3-7)$$

$$\text{soit, } 4y_2 = 2(4x_2 + x_4) \quad (3-8)$$

La combinaison des équations (3-4) et (3-8) conduit à l'obtention de la relation suivante :

$$x_4 = Cx_1 \quad (3-9)$$

La combinaison des équations (3-3), (3-6), et (3-9) d'autre part, conduit à l'obtention de la relation suivante :

$$x_3 = y_3 \quad (3-10)$$

$$\text{avec, } x_3 = 0,1 \times \frac{dv_{HNO_3}}{v} \quad (3-11)$$

où dv_{HNO_3} est le volume de solution de HNO_3 ajouté dans la solution de travail pour ajuster le pH à la valeur souhaitée. De plus x_1 et x_2 sont choisis tels que $x_2 = \frac{1}{2}x_1$ pour respecter les proportions stœchiométriques des CPP $(Ca/P)_{sol.} = 1$. L'équation (3-4) devient alors :

$$y_2 = (1 + \frac{1}{2}C)x_1 \quad (3-12)$$

Dans le cas de cette étude la valeur de la force ionique choisie ($I = 0,1$ M) sera proche de celle d'un liquide synovial. Si elle n'est pas assez élevée on ajustera cette dernière à la valeur voulue en augmentant la concentration en KNO_3 de toutes les solutions d'une valeur x_5 telle que l'équation suivante soit respectée pour $I = 0,1$ M :

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{i=5} x_i z_i^2 \quad (3-13)$$

où z_i représente la charge d'une espèce i de concentration x_i . Deux nouvelles variables ont donc été définies :

	Solution de travail	Solutions titrantes
[KNO₃]	x_5	y_5

Pour maintenir constante la concentration en KNO_3 on pose $x_5 = y_5$ et l'équation (3-13) s'écrit alors :

$$I = \frac{1}{2} [(2x_1 + x_3 + x_4 + x_5) \times 1^2 + (4x_2 + x_4 + x_5) \times 1^2 + (x_1) \times 2^2 + (x_2) \times 4^2] \quad (3-14)$$

$$I = x_1(8 + C) + \frac{1}{2}x_3 + x_5 \quad (3-15)$$

On obtient finalement :

$$x_5 = I - x_1(8 + C) - \frac{1}{2}x_3 \quad (3-16)$$

La concentration totale de KNO_3 dans la solution de travail est donc égale à $(x_4 + x_5)$. La combinaison des équations (3-9) et (3-16) conduit à l'obtention de la relation suivante :

$$x_5 + x_4 = I - 8x_1 - \frac{1}{2}x_3 \quad (3-17)$$

La composition de la solution sursaturée métastable de travail et des solutions titrantes est celle reportée dans le tableau ci-après.

	Solution de travail	Solution titrante 1	Solution titrante 2
[Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O]	x_1	$y_1 = 2x_1 + Cx_1$	-
[K ₄ P ₂ O ₇]	$x_2 = \frac{1}{2}x_1$	-	$y_2 = (1 + \frac{1}{2}C)x_1$
[HNO ₃]	$x_3 = 0,1 \times \frac{dv_{\text{HNO}_3}}{v}$	$y_3 = x_3$	$y_3 = x_3$
[KNO ₃]	$x_5 + x_4 = I - 8x_1 - \frac{1}{2}x_3$	$y_5 = x_5 = I - x_1(8 + C) - \frac{1}{2}x_3$	$y_5 = x_5 = I - x_1(8 + C) - \frac{1}{2}x_3$

Annexe 4- FIGURES COMPLEMENTAIRES

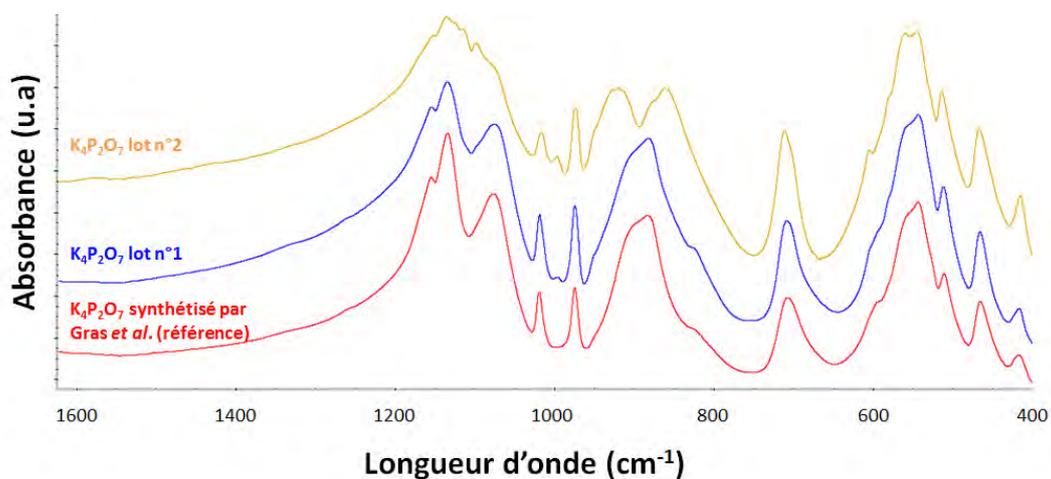


Figure 4-1- Spectres FTIR de la poudre de $K_4P_2O_7$ synthétisée par P. Gras (Gras 2014) à partir du lot n°1 de K_2HPO_4 et de précurseurs $K_4P_2O_7$ utilisés lors de cette étude, obtenus après traitement thermique à 600°C pendant 4h à partir du lot n°1 utilisé par P. Gras et d'un lot neuf (lot n°2).

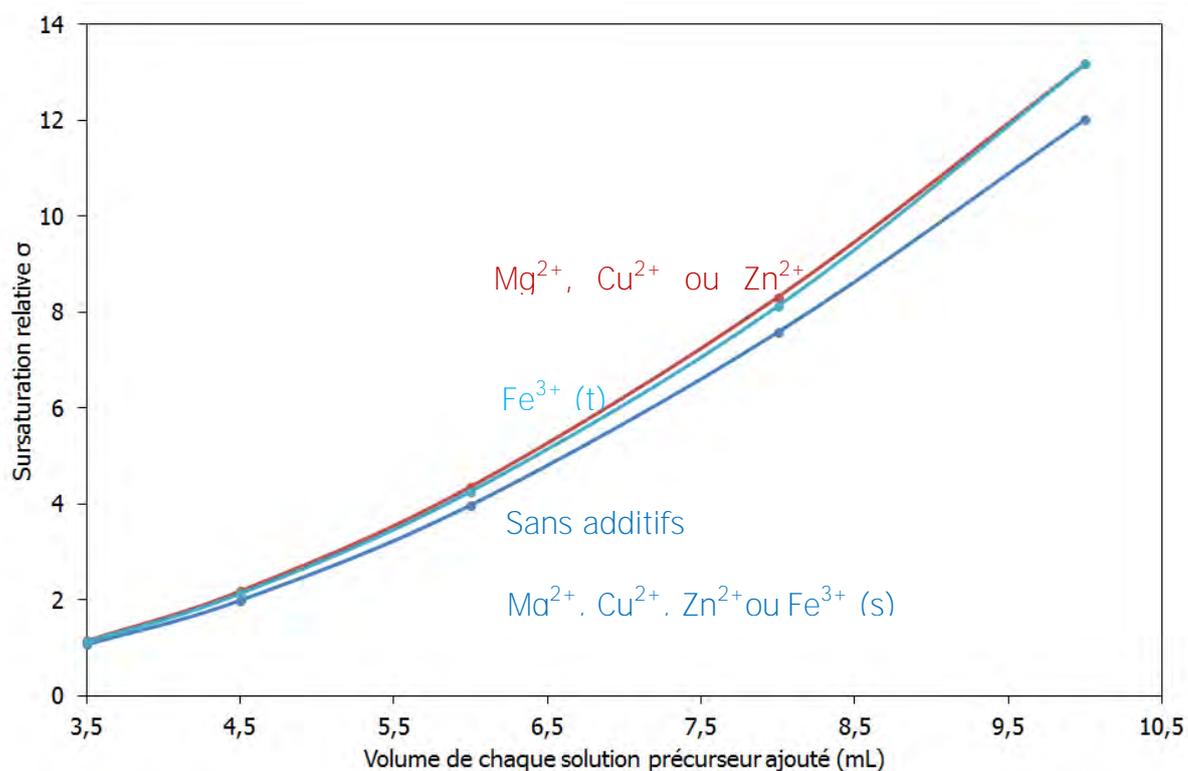


Figure 4-2- Courbes de sursaturation relative vis-à-vis de la phase *t*-CPPD au début de sa synthèse (à partir de la formation des premiers cristaux) en fonction du volume de solution précurseur ajouté à débit constant ($2,25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) et en présence ou non d'un additif cationique introduit dans la solution tampon (t) ou dans la seringue contenant la solution de calcium (s).

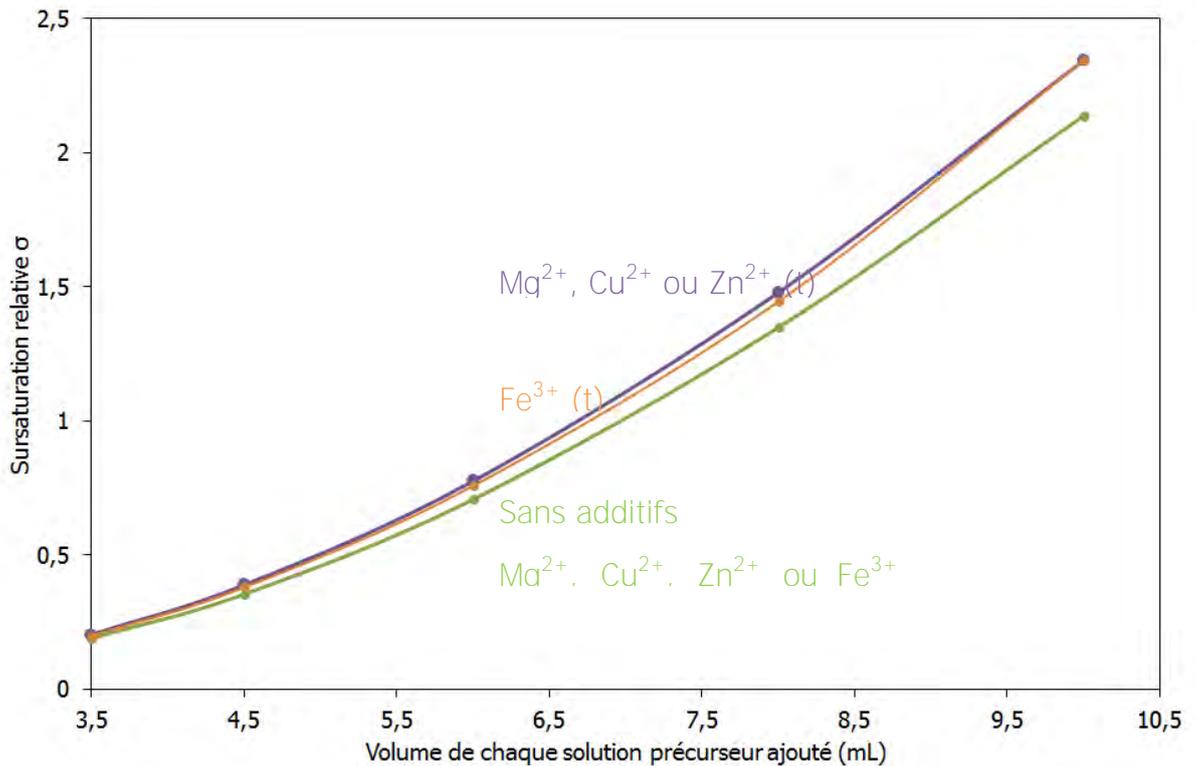


Figure 4-3- Courbes de sursaturation relative vis-à-vis de la phase m-CPPD au début de sa synthèse en fonction du volume de solution précurseur ajouté à débit constant ($2,25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) et en présence ou non d'additif cationique introduit dans la solution tampon (t) ou dans la seringue contenant la solution de calcium (s).

L'introduction d'additifs cationiques dans la solution de nitrate de calcium ne change pas la sursaturation initiale dans la solution tampon au début de la synthèse de CPPD.

Rappelons que dans PHREEQC la sursaturation S est définie comme étant le rapport :

$$\sigma = \frac{Q}{K_s} \quad (4-1)$$

avec Q le quotient des activités des ions Ca^{2+} et $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ et K_s le produit de solubilité.

Or les activités des ions i sont définies par l'équation (I-11) rappelé ci-dessous :

$$a_i = \gamma_i \cdot C_i \quad (I-11)$$

où C_i représente la concentration des espèces i et où le coefficient d'activité γ_i dépend de la force ionique selon l'équation I-37 (rappelé ci-dessous) donnée par le modèle de Davies utilisé pour décrire nos solutions.

$$\ln \gamma_i = -0,5z_i^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0,3I \right) \quad (I-37)$$

Or la force ionique dépend des concentrations de tous les ions en solution selon l'équation suivante :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i \cdot Z_i^2 \quad (4-2)$$

où C_i représente la concentration molaire de l'ion i et z_i sa charge.

C'est pourquoi en présence d'une forte concentration initiale en additifs ionique dans la solution tampon la sursaturation vis à vis des phases m- et t-CPPD est changée et que dans le cas de l'ion F^{3+} la sursaturation est différente que pour les additifs ionique chargé (+II).

Ces courbes de sursaturation 4-2 et 4-3 représentant les variations de sursaturations σ en tout début de précipitation pour un système (avec ou sans additifs ioniques) d'abord sous saturé puis qui présente de la nucléation, permettent de visualisé l'influence des additifs sur la σ initiale.

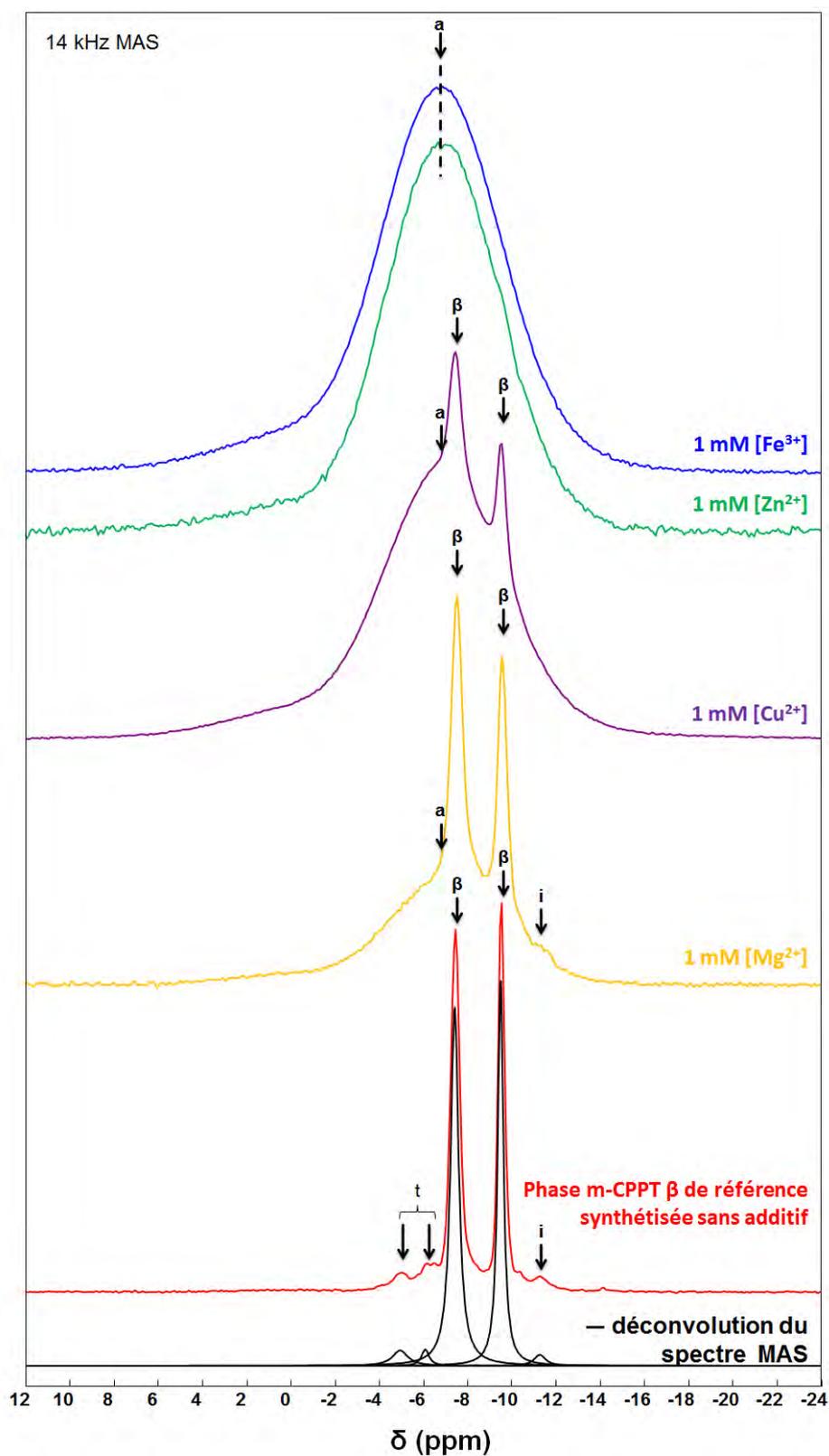


Figure 4-4- Spectres RMN à l'angle magique (MAS) du ³¹P (découplé de ¹H lors de l'acquisition) des échantillons de référence (sans additif) et de ceux synthétisés en présence de 1,00 mM de Cu²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ ou Fe³⁺ introduit dans la solution de réactif de calcium. Les différentes composantes des spectres MAS sont repérées par les notations suivantes : t (t-CPPD), β (m-CPPT β), a (a-CPP) et i (indéterminé).

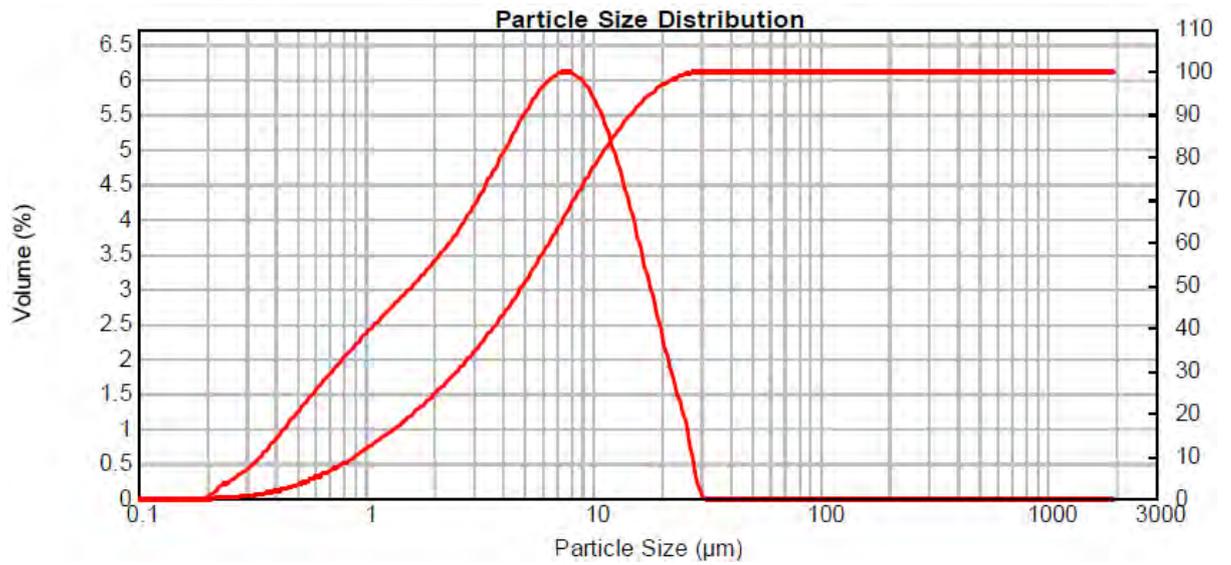


Figure 4-5- Courbes de distribution granulométrique (en fréquence cumulée et en fréquence relative) de la poudre m-CPD de référence.

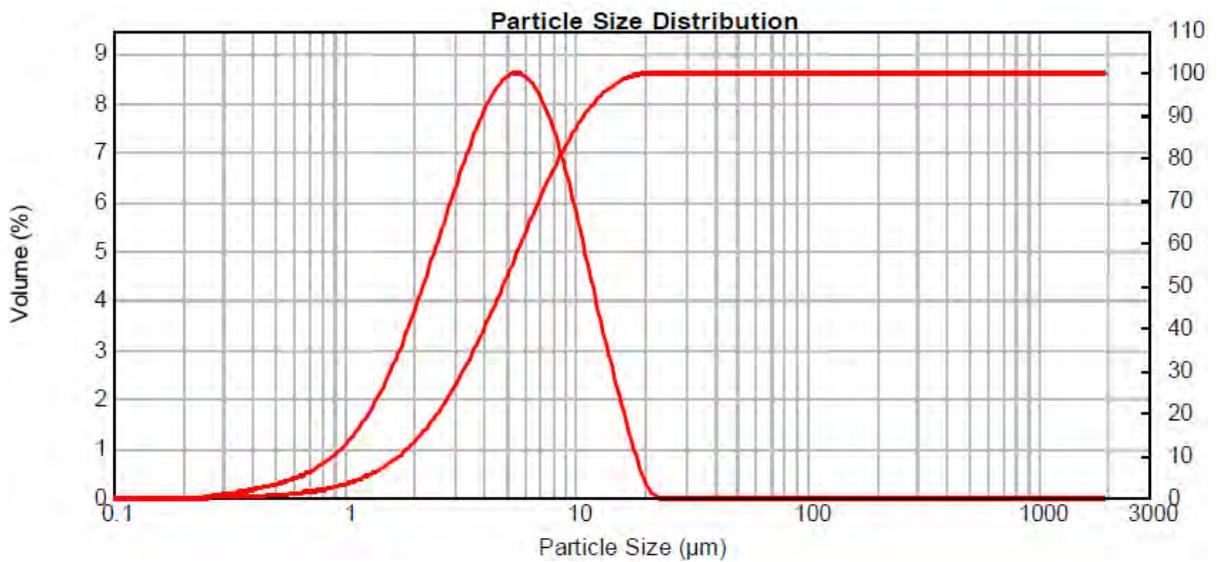


Figure 4-6- Courbes de distribution granulométrique (en fréquence cumulée et en fréquence relative) de la poudre m-CPPT β de référence.

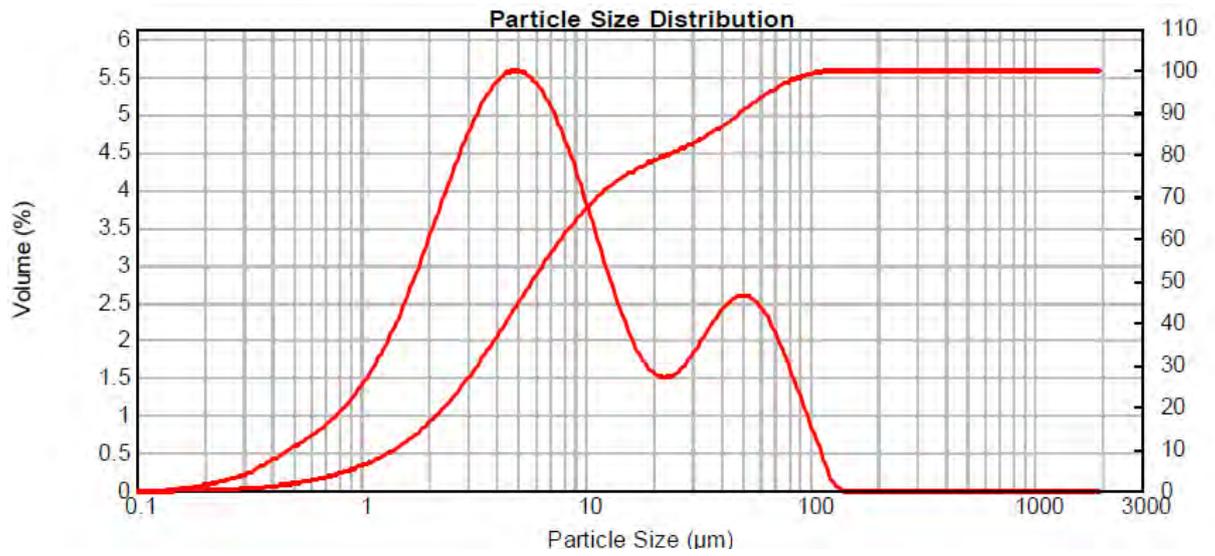


Figure 4-7- Courbes de distribution granulométrique (en fréquence cumulée et en fréquence relative) de la poudre t-CPPD de référence.

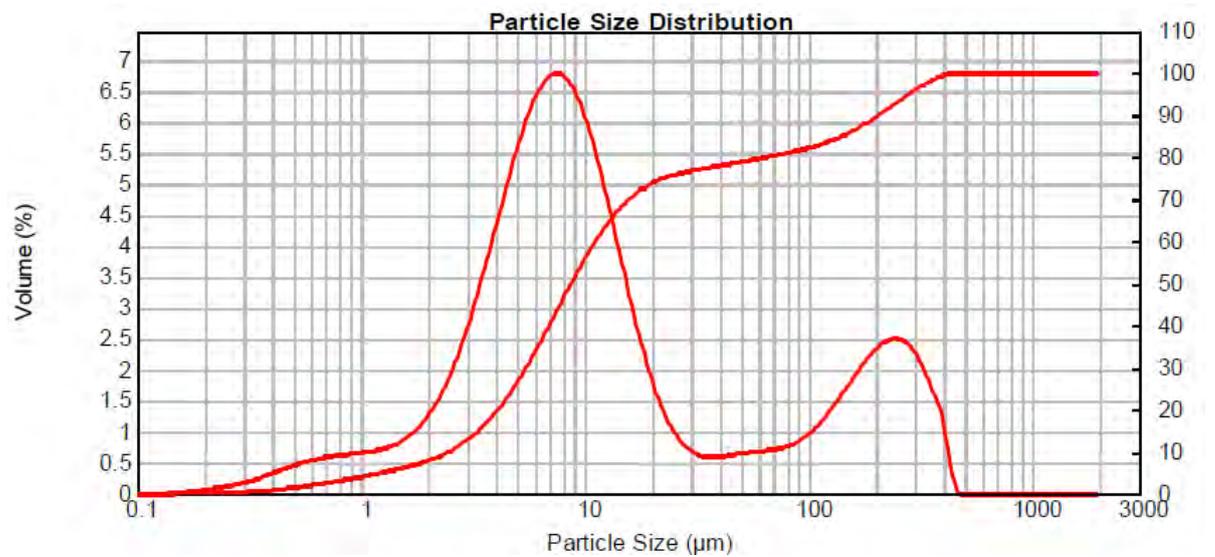


Figure 4-8- Courbes de distribution granulométrique (en fréquence cumulée et en fréquence relative) de la poudre a-CPPD de référence.

Effect of ionic additives on the precipitation of calcium pyrophosphate crystals associated to the osteoarthritis.

Abstract:

Osteoarthritis (OA) affects about ten million people in France. The presence of microcrystals including those of calcium pyrophosphate (CPP) dihydrates ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; mono- and/or triclinic: m-CPPD and/or t-CPPD respectively) in the joints has been identified as an aggravating factor of OA. However the conditions of formation of both CPPD phases and their order of appearance remain unknown or have not been totally described and the existing treatments are only symptomatic. In the present work we were interested in the effect of ionic additives on the formation and the kinetics of the crystallization of CPP which is a key step in the medium to long term development of a therapeutic strategy to prevent the formation of these crystals, their transformation or their dissolution.

At first the *in vitro* synthesis by precipitation of hydrated CPP pure phases of biological interest (m-CPPD, t-CPPD and monoclinic CPP tetrahydrated β) have been realized to identify the operating parameters (concentration, pH, temperature) leading to their formation and to analyze the effect of ionic additives (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} or $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) on their precipitation under controlled conditions. To achieve this objective, the synthesis method developed by Gras *et al.* was transposed in stirred reactor. It consists in a precipitation by simultaneous addition of two reagent solutions of calcium nitrate and potassium pyrophosphate in an ammonium acetate buffer solution. Powders synthesized were analyzed by X-ray diffraction, solid state nuclear magnetic resonance, FTIR and RAMAN spectroscopies, scanning electron microscopy and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. Thanks to a semi-quantitative analysis by X-ray diffraction, we showed that the presence of ionic additives (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} or Cu^{2+}) during the precipitation significantly modified the proportions of CPP phases constituting the final product. We showed that Mg^{2+} , Cu^{2+} or Zn^{2+} promote the formation of m-CPPD crystals during the precipitation under controlled conditions for t-CPPD phase synthesis and depending on the conditions Fe^{3+} ion can completely inhibit t-CPPD phase crystallization. ^{31}P solid state NMR fine analyzes have allowed determining the mode of action of these ionic additives. Thus, Cu^{2+} or Mg^{2+} ions have substituted for Ca^{2+} in the CPP lattice.

Additionally, we have implemented the method of constant composition crystal growth to study the nucleation and crystal growth at constant temperature, pH, supersaturation and ionic strength of t-CPPD on seeds of t-CPPD crystals in the presence or not of ionic additive. The seed was introduced into a supersaturated metastable solution of calcium pyrophosphate at pH 6.2 including the ionic additive and placed in a stirred reactor maintained at 37°C. Supersaturation of the medium was calculated using Phreeqc software and nucleation time and the initial rate of crystal growth were determined. The resulting crystals were analyzed by FTIR spectroscopy and scanning electron microscopy. We were able to highlight the influence of ionic additives (Mg^{2+} , Zn^{2+} or Cu^{2+}) on the kinetic parameters of nucleation and crystal growth of t-CPPD. Thereby, Cu^{2+} and Mg^{2+} ions have respectively inhibited partially and totally the growth of the t-CPPD crystals.

These results may help to explain why m-CPPD phase is identified *in vivo* in the joint of arthritic patients while this pure phase is difficult to obtain by *in vitro* precipitation (very narrow temperature-pH domain in a medium free of any ionic additives). These results could also provide indications on the order of appearance and potential evolutions of m-CPPD and t-CPPD phases formed *in vivo* in osteoarthritic joints and provide some clues to avoid the formation of CPPD crystals with inflammatory potential or orient the formation of non-inflammatory CPP phases.

Effet d'additifs ioniques sur la précipitation de cristaux de pyrophosphate de calcium associés à l'arthrose.

Résumé :

L'arthrose affecte une dizaine de millions de personnes en France. La présence de microcristaux calciques notamment ceux de pyrophosphates de calcium (CPP) dihydratés ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; mono- et/ou triclinique : respectivement m-CPPD et/ou t-CPPD) au sein de l'articulation est l'un des facteurs aggravant identifié de cette maladie. Cependant, les conditions et mécanismes de formation de ces cristaux ainsi que l'ordre d'apparition de ces deux phases de CPPD restent méconnus ou n'ont pas encore été entièrement décrits et les traitements existants sont seulement symptomatiques. Dans ce mémoire nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet d'additifs ioniques sur la formation et les cinétiques de croissance cristalline de cristaux de CPP qui constitue une étape clé pour la mise au point à moyen ou long terme d'une stratégie thérapeutique visant à empêcher la formation de ces cristaux, à les transformer ou à les dissoudre.

Dans un premier temps, la synthèse *in vitro* par précipitation des phases pures de pyrophosphates de calcium hydratés d'intérêt biologique (m-CPPD, t-CPPD et CPP monoclinique tétrahydraté β) a été réalisée afin d'identifier les paramètres opératoires (concentrations, pH, température) conduisant à leur apparition et d'analyser l'effet d'additifs ioniques (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} ou $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) lors de leur précipitation en conditions maîtrisées. Pour atteindre ces objectifs, la méthode de synthèse établie par Gras *et al.* a été transposée en réacteur agité. Il s'agit d'une précipitation avec ajout simultané de deux solutions mères respectivement de nitrate de calcium et de pyrophosphate de potassium dans une solution tampon d'acétate d'ammonium à l'aide de pompes seringue permettant un contrôle fin du débit. Les composés ainsi obtenus ont été caractérisés par diffraction des rayons X, résonance magnétique nucléaire du solide, spectroscopies FTIR et RAMAN, microscopie électronique à balayage et spectrométrie à plasma à couplage inductif. Grâce à une analyse semi-quantitative par diffraction des RX, nous avons montré que la présence d'additifs ioniques (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} ou Cu^{2+}) lors de la précipitation change significativement les proportions des phases de CPP constituant le produit final. Ainsi nous montrons que les ions Mg^{2+} , Cu^{2+} ou Zn^{2+} orientent la formation de cristaux de type m-CPPD lors de la précipitation en conditions maîtrisées de la phase t-CPPD, et selon les conditions l'ion Fe^{3+} peut totalement inhiber la cristallisation de t-CPPD. Des analyses fines par RMN du solide ^{31}P ont permis de déterminer les modes d'action de ces additifs. Ainsi les ions Cu^{2+} et Mg^{2+} ont notamment agi par substitution au Ca^{2+} dans la maille de CPP.

Complémentairement, nous avons mis en œuvre la méthode de croissance cristalline à composition constante pour étudier la germination et la croissance cristalline à température, pH, sursaturation et force ionique constants de t-CPPD sur des cristaux de semence de t-CPPD en présence ou non d'additif ionique. La semence est introduite dans une solution sursaturée métastable de pyrophosphate de calcium à pH 6,2 incluant l'additif ionique et placée dans un réacteur agité et thermostaté à 37°C. La sursaturation du milieu est calculée à l'aide du logiciel Phreeqc et les temps de germination ainsi que les vitesses initiales de croissance cristalline ont été déterminés. Les cristaux ont été analysés par spectroscopie FTIR et microscopie électronique à balayage. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'influence d'additifs ioniques (Mg^{2+} , Zn^{2+} ou Cu^{2+}) sur les paramètres cinétiques de germination et de croissance cristalline de la phase t-CPPD. Ainsi les ions Cu^{2+} et Mg^{2+} ont respectivement inhibé partiellement et totalement la croissance cristalline de t-CPPD.

Les résultats obtenus dans cette étude pourraient aider à expliquer la formation *in vivo* de cristaux de m-CPPD au sein des articulations de patients arthritiques alors que cette phase pure est difficile à obtenir *in vitro* par précipitation sans ions autres que Ca^{2+} et $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$. Ces résultats cinétiques pourront aussi donner une indication sur l'évolution du ratio des deux phases (m-CPPD et t-CPPD) formées *in vivo* dans les articulations arthrosiques et donner des pistes de traitement pour éviter la formation de ces cristaux inflammatoires ou orienter la formation de phases CPP non inflammatoires.