



HAL
open science

Mécanismes d'adsorption du risédronate par des phosphates de calcium biologiques: applications aux biomatériaux

Farid Errassifi

► **To cite this version:**

Farid Errassifi. Mécanismes d'adsorption du risédronate par des phosphates de calcium biologiques: applications aux biomatériaux. Matériaux. Faculté des Sciences Semlalia-Marrakech, 2011. Français. NNT: . tel-00667418

HAL Id: tel-00667418

<https://theses.hal.science/tel-00667418>

Submitted on 7 Feb 2012

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.

THÈSE

présentée à la Faculté pour obtenir le grade de :

Docteur

UFR : Physico-Chimie des Matériaux

Spécialité : Physico-Chimie des Matériaux

**MECANISMES D'ADSORPTION DU RISEDRONATE PAR
DES PHOSPHATES DE CALCIUM BIOLOGIQUES :
APPLICATIONS AUX BIOMATERIAUX**

Par

Farid ERRASSIFI

(DESA : Physico-Chimie des Matériaux)

Soutenue le 30 Avril 2011 devant la commission d'examen :

Président :**C. Rey** PES Institut National Polytechnique, ENSIACET, Toulouse**Examineurs :****E. Zahidi** PES Université Chouaib Doukkali, FS, El Jadida**M. Lakraimi** PES Université Cadi Ayyad, ENS, Marrakech**A. Baçaoui** PES Université Cadi Ayyad, FSS, Marrakech**S. Sarda** MC Université Paul Sabatier, IUT, Toulouse**A. Legrouri** PES Université Al Akhawayn, FSI, Ifrane**A. Barroug** PES Université Cadi Ayyad, FSS, Marrakech**Invité :** **S. Zayane** PhD Chirurgien Orthopédiste et Traumatologue, Marrakech

**UNIVERSITE CADI AYYAD
FACULTE DES SCIENCES
SEMLALIA – MARRAKECH**

N° d'ordre

THÈSE

Présentée à la Faculté pour obtenir le grade de:

Docteur

UFR: Physico-Chimie des Matériaux

Spécialité: Physico-Chimie des Matériaux

MECANISMES D'ADSORPTION DU RISEDRONATE PAR DES PHOSPHATES DE CALCIUM BIOLOGIQUES : APPLICATIONS AUX BIOMATERIAUX

Par:

Farid ERRASSIFI

(DESA : Physico-Chimie des Matériaux)

Soutenue le 30 Avril 2011

devant la commission d'examen :

Président :

C. Rey PES Institut National Polytechnique, ENSIACET, Toulouse

Examineurs :

E. Zahidi PES Université Chouaib Doukkali, FS, El Jadida

M. Lakraimi PES Université Cadi Ayyad, ENS, Marrakech

A. Baçaoui PES Université Cadi Ayyad, FSS, Marrakech

S. Sarda MC Université Paul Sabatier, IUT, Toulouse

A. Legrouri PES Université Al Akhawayn, FSI, Ifrane

A. Barroug PES Université Cadi Ayyad, FSS, Marrakech

Invité : S. Zayane PhD Chirurgien Orthopédiste et Traumatologue, Marrakech

*Vous pouvez tout faire, penser ou croire,
posséder toute la science du monde, si vous
n'aimez pas, vous n'êtes rien*

*Marcelle Sauvageot (1900-1934)
Laissez-Moi*

A la mémoire de ma mère

A ma Chère aimée

A mon père

A mes frères Ahmed, Omayma & Nizare

A tous mes amis

Remerciements

Les études rapportées dans ce mémoire ont été réalisées en co-direction entre le Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux et Environnement de la Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech et l'équipe de Phosphates, Pharmacotechnie et Biomatériaux de l'Institut National Polytechnique de Toulouse. Ce travail a bénéficié du support financier alloué à l'action intégrée du ministère de l'éducation nationale (AI Volubilis MA/05/122).

Je suis profondément reconnaissant à Monsieur le Professeur A. Barroug de m'avoir encadré tout au long de ces années et m'avoir fait bénéficier de ses précieuses idées et connaissances scientifiques. Ses conseils avisés m'ont permis une réflexion lors de la rédaction de ce mémoire. Nos longues discussions animées et fructueuses ont conduit à l'aboutissement de ce travail. Je lui exprime ma plus grande gratitude pour la confiance et l'attention exprimées à mon égard.

Il m'est aussi agréable d'exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur A. Legrouri, doyen de la Faculté des Sciences et d'Ingénierie d'Al Akhawayn, qui a coencadré ce travail malgré ses nombreuses occupations. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour les précieux conseils et encouragements tout au long de ce travail.

Que Monsieur C. Rey, Professeur à l'Institut National Polytechnique de Toulouse, trouve ici l'expression de ma profonde et sincère gratitude pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour l'intérêt constant qu'il a manifesté pour mes recherches et les conseils éclairés qu'il m'a prodigué pour le développement de ce travail. Merci pour votre sens de la pédagogie, votre sens de l'humanité et des valeurs. Vous m'avez fait un grand honneur en acceptant de présider le jury de cette thèse.

La grande rigueur, la disponibilité et patience ainsi que les qualités humaines dont a fait preuve le Dr S. Sarda, Maître de Conférences de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, m'ont permis d'atteindre un niveau d'exigence remarquable qui me met grandement en valeur. Je tiens à l'assurer de mon entière reconnaissance et du réel plaisir éprouvé au cours de mon séjour scientifique.

Un grand hommage à Monsieur A. Lebugle, Directeur de recherche au C.N.R.S, qui n'a cessé de me prodiguer conseils et attention, clairvoyantes critiques, et rigoureux jugements, toujours accompagnés d'une grande gentillesse dans la progression de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'exprime mes vifs remerciements à Messieurs les Professeurs E. Zahidi, M. Lakraimi et A. Baçaoui pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail ainsi que pour l'intérêt et les critiques à l'égard du contenu de ce manuscrit.

Qu'il me soit permis de témoigner de ma profonde gratitude à Monsieur Dr. S. Zayane pour les moments de réflexion concernant l'intérêt médical de cette étude et de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Mes remerciements vont tout naturellement à Madame C. Combes, Maître de Conférences et responsable de l'équipe de Phosphates, Pharmacotechnie et Biomatériaux à l'Institut National Polytechnique de Toulouse, pour son accueil, ses encouragements et son aide précieuse sans jamais perdre le sourire.

Le savoir faire dans le domaine de la RMN du solide et l'expérience très large de Monsieur H. Sfihi, Professeur agrégé de l'Université Paris 13, m'ont été d'une grande utilité et d'une véritable contribution à ce travail. Je lui exprime ma respectueuse gratitude.

Comme il ne m'est pas possible de citer toutes les personnes sans qui tout aurait été nettement plus fade et que je souhaite éviter d'en oublier, je voudrais exprimer toute mon amitié à :

- tous les membres de l'équipe Phosphates, Pharmacotechnie et Biomatériaux pour leur gentillesse, le partage des connaissances scientifiques, leur collaboration, leur soutien, l'esprit d'équipe et la joie de vivre qu'ils font rayonner autour d'eux.
- tous mes collègues chercheurs du centre Jabir pour la sympathie qu'ils m'ont témoignée tout au long de ces années passées à la FSSM.
- mes anges d'enfance et aux beaux moments vécus ensemble à Essaouira.

Sachez que votre amitié et votre solidarité m'ont permis d'éviter la noyade pour arriver sur la rive d'en face, celle de la soutenance. Vous êtes ma grande famille, ma richesse et ma source d'inspiration inépuisable.

Les meilleures choses ont une fin et à cet instant en ce qui concerne ce manuscrit pour moi c'est fini. C'est donc avec une certaine émotion que je vous confie cet épisode passionnant de ma vie résumé dans ces quelques pages en souhaitant par-dessus tout qu'il vous soit utile.

Bonne lecture, Farid Errassifi.

-

RESUME

Notre travail de thèse porte sur la réactivité de phosphates de calcium biomimétiques vis-à-vis d'un agent thérapeutique de la famille des bisphosphonates : le risédronate. Ce médicament actuellement commercialisé sous le nom de « Actonel », est préconisé pour le traitement de certaines affections du tissu osseux telle que l'ostéoporose. Nous nous proposons dans cette contribution d'élucider les mécanismes d'interaction se produisant à l'interface entre des matériaux apatitiques de choix et le risédronate; pour cela les propriétés physico-chimiques des supports examinés ainsi que les caractéristiques de la solution d'incubation ont été prises comme variables expérimentales.

L'étude d'adsorption nous a amené dans un premier temps à élaborer des phosphates de calcium présentant différentes caractéristiques physico-chimiques. Pour cela nous avons fait varier les conditions de synthèse (taux de saturation, température, durée de maturation, vitesse d'addition des réactifs...). Nous avons ensuite préparé des sels de risédronate de calcium, et ce afin de spécifier la nature des interactions entre molécules de risédronate et ions calcium en solution. Pour préciser les caractéristiques physicochimiques des précipités (index de cristallinité, modifications structurales, altérations morphologiques...), nous avons fait appel à diverses techniques physico-chimiques complémentaires (DRX, FTIR, Raman, RMN de l'état solide, MEB, MET, ATD/ATG, BET, complexométrie et analyses chimiques).

Les solides précipités sont des apatites phosphocalciques qui présentent des compositions chimiques variables (rapport atomique Ca/P de 1,33 à 1,65) ainsi que des propriétés structurales et microstructurales différentes. Leur surface spécifique couvre la gamme de 49 à 201 m²/g. Les solides élaborés dans des conditions physiologiques de pH et de température sont des apatites nanocristallines de basse cristallinité, analogues au minéral osseux; ils sont dotés à leur surface d'une couche hydratée riche en environnements non apatitiques. Ces espèces labiles sont absentes pour l'hydroxyapatite bien cristallisée.

L'étude d'adsorption des molécules de risédronate dans tous les cas examinés montre que la fixation de ces espèces par les supports apatitiques se fait selon une cinétique rapide, ce qui atteste de la grande réactivité de ces matériaux vis-à-vis de leur environnement. L'allure des isothermes d'adsorption obtenues dans un domaine de faibles concentrations sont de type Langmuir. La réactivité des solides examinés vis-à-vis des molécules d'adsorbat a été discutée sur la base des caractéristiques physico-chimiques du système. Ainsi divers facteurs sont à prendre en considération pour expliquer la différence de comportement de ces matériaux (composition chimique du support et de la solution, état de surface et présence d'environnement labiles en particulier, microstructure...).

L'analyse globale des résultats d'adsorption issus des effets de la composition de la solution sur la fixation des molécules de risédronate et de l'adsorption sur les proportions des ions en solution met en évidence une corrélation entre les groupements phosphonate de la solution et les ions phosphate de la surface des supports. Cette observation traduit l'existence d'un processus d'échange impliquant ces espèces à l'interface minéral-milieu environnant. L'étude menée avec des apatites de basse cristallinité à différents stades de maturation confirme l'implication de cette force motrice. Toutefois, l'évolution des proportions en ions calcium échangées lors de l'adsorption laisse penser que d'autres phénomènes peuvent intervenir. Ainsi l'étude menée dans une gamme de concentration élevée en adsorbat montre des isothermes à plateaux, traduisant l'existence de processus complexes à la surface du solide. En outre, l'étude approfondie réalisée par spectroscopies Infrarouge et Raman et par RMN, sur des supports après contact avec les molécules d'adsorbat, atteste de la présence de fortes interactions impliquant les groupements fonctionnels de l'adsorbat et les sites calcium de la surface des apatites. L'étude comparée avec les sels de risédronate de calcium précipités confirme la formation de phase amorphe typique du composé Ca₂BP.

L'évolution des nanocristaux apatitiques en présence des molécules de risédronate affecte très peu la composition de la couche hydratée à leur surface et inhibe, par conséquent leur processus de maturation. Sur le plan biologique, la localisation de ces principes actifs à la surface du minéral osseux pourrait être bénéfique dans la mesure où ces espèces peuvent bloquer le processus de vieillissement du tissu osseux et préserver sa réactivité.

Afin de limiter les effets secondaires des molécules de bisphosphonates, d'une part, et d'améliorer leur biodisponibilité locale en vue d'élargir leur champ d'application thérapeutique, d'autre part, une approche par diffusion locale semble une voie intéressante. L'ensemble des résultats issus de ce travail constitue une plate forme pour la mise au point d'un dispositif de vectorisation locale du risédronate par des substituts osseux phosphocalciques.

- Mots clés : Adsorption, Apatite, Bisphosphonate, Désorption, Echange ionique, Maturation, Phosphates de calcium, Risédronate.

ABSTRACT

Our work is focused on the reactivity of biomimetic calcium phosphate towards a therapeutic agent from Bisphosphonates family: risedronate. This drug is currently marketed under the name of “Actonel” and used in the treatment of several diseases related to bone tissue such as osteoporosis. We purpose in this paper to elucidate the mechanisms of interaction occurring at the interface between apatite and risedronate. In order to do that, the physico-chemical properties of materials examined and the characteristics of the solution were taken as experimental variables.

The study of adsorption led us initially to develop calcium phosphates with different physico-chemical characteristics. For this the experimental synthesis conditions are varied (degree of saturation, temperature, maturation time, pH...). In order to specify the nature of the interactions between risedronate molecules and calcium ions in solution, a calcium risedronate salt are prepared. To clarify the physico-chemical characteristics of the precipitates (crystallinity index, structural and morphological changes, formation of insoluble salts) several complementary physico-chemical techniques are used (XRD, FTIR, Raman, solide state NMR, SEM, TEM, DTA/TGA, BET, chemical analysis and complexometric study).

The precipitated solids are calcium phosphate apatites wich have variable chemical compositions (atomic ration Ca/P from 1,33 to 1,65) as well as different structural and microstructural properties. Their specific surface area covers the range from 49 to 201 m²/g. The solids synthesized under physiological conditions of pH and temperature are nanocrystalline apatites of low crystallinity, similar to bone mineral. One of the most interesting characteristics of these biomimetic apatite nanocrystals is the existence of a surface hydrated layer essentially formed of non-apatitic environments of phosphate and carbonate ions. These labile species are not observed on well crystallized hydroxyapatite.

In all cases, the adsorption data were well described by a Langmuir adsorption isotherm. The rate of risedronate adsorption is extremely rapid, witch attests to the high interaction between calcium phosphate surface and bisphosphonate species. The reactivity of solids examined versus the adsorbate molecules was discussed on the basis of the physico-chemical system characteristics. Then, various factors are taken into consideration to explain the difference in behaviour of these materials (chemical composition of both adsorbents and solution, surface reactivity and existence of non-apatitic environments, microstructure,...).

The overall analysis of results from the solution composition influence on the risedronate binding and adsorption effect on the apatite dissolution shows a correlation between the phosphonate groups of the solution and phosphate ions from the surface of the supports. This observation reflects the existence of an exchange process involving these species in mineral-interface environment. The study of poorly crystalline at different stages of maturation confirms the involvement of this surface substitution reaction. However, the evolution of calcium content during the adsorption suggests that other phenomena may intervene. Thus at higher concentrations of adsorbate the uptake curve increase steeply, indicating the existence of complex processes at the mineral surface. In addition, a study conducted by Raman and Infrared spectroscopy and NMR, on supports after contact with the adsorbate molecules, attests to the presence of strong interactions involving the functional groups of the adsorbate and calcium sites on apatite surface. The study compared with risedronate salts of calcium precipitates confirmed the formation of amorphous phase typical of Ca₂BP compound.

The evolution of apatite nanocrystals in the presence of risedronate molecules affects very little the composition of surface hydrated layer and inhibits therefore their maturation process. Biologically, the location of these drugs on the surface of bone mineral may be beneficial to the extent that these species can block the aging process of bone tissue and maintaining its reactivity.

To minimize the side effects of bisphosphonates molecules and improve their local bioavailability in order to broaden their scope of treatment, a local diffusion approach seems an interesting way. All results from this work are a platform for the development of biomaterials as a risedronate delivery system.

Keywords: Adsorption, Apatite, Bisphosphonate, Desorption, Ionic Exchange, Maturation, Calcium Phosphate, Risedronate.

ملخص

تتركز الأبحاث التي أنجزت في إطار هذا العمل على دراسة تفاعلية فوسفات الكالسيوم بدواء ينتمي إلى فصيلة البيسفوسفونات و يسمى بالغيزيدونات (Risédronate). يجري تسويق هذا الدواء تحت اسم " Actonel ". يستعمل هذا الدواء خاصة لعلاج أمراض معينة تصيب النسيج العظمي مثل ترقق العظام أو هشاشتها. نقترح في هذا العمل إلقاء الضوء على آليات و ميكانيزمات التفاعل بين مواد معدنية اصطناعية بديلة للنسيج العظمي و المكون الأساسي لدواء الغيزيدونات. لهذا الغرض فالخصائص الكيميائية و الفيزيائية للمواد المعدنية و محاليل التفاعل أخذت كمتغيرات تجريبية. المعارف المكتسبة من هذا العمل يمكن تسخيرها في تطوير مواد مركبة لسد الخصاص العظمي و علاجه.

من أجل دراسة خصائص التصاق جزيئات هذا الدواء و تفاعليته قمنا بتصنيع فوسفات الكالسيوم ذات خصائص فيزيائية و كيميائية مختلفة. لهذا الغرض قمنا بتغيير ظروف ترسيب هذه المواد (درجة الإشباع, درجة الحرارة, مدة النضح...). قمنا كذلك بترسيب أملاح من الكالسيوم و الغيزيدونات لكي نلم بطبيعة التفاعلية بينهما. لتوضيح و معرفة الخصائص الفيزيائية و الكيميائية للمواد المحضرة (درجة البلورة, التغيرات الهيكلية و المورفولوجية....) استخدمنا عدة تقنيات متكاملة في ما بينها (حيود الأشعة السينية DRX, رامان Raman, التحليل الطيفي بالأشعة ما تحت الحمراء FTIR, الرنين المغناطيسي النووي RMN, المجهر الإلكتروني للمسح و للإنتقال MEB/MET, التحليل الحراري ATD/ATG, طريقة BET و معايرة العناصر الكيميائية).

الرواسب المحضرة هي فوسفات الكالسيوم ذات تركيب كيميائية مختلفة (نسبة الكالسيوم/نسبة الفوسفات تتراوح ما بين 1,33 و 1,65) و خصائص هيكلية و مجهريه مختلفة. مساحة السطح المحددة بطريقة BET تغطي نطاق 49 حتى 201 m²/g. المواد الصلبة التي أنتجت في ظروف فيزيولوجية هي فوسفات الكالسيوم ذات درجة بلورة منخفضة و تشبه المعادن التي تشكل النسيج العظمي و يتشكل سطحها من طبقة غنية بأيونات الفوسفات و الكربونات الغير الأباتيتية. هذه الخصائص لا نلاحظها في المعادن ذات درجة بلورة عالية كالهيدروكسيأباتيت.

دراسة التصاق جزيئات الغيزيدونات في جميع الحالات تبين أن الربط يتم بحركية سريعة مما يدل على تفاعلية عالية لسطح هذه المواد مع جزيئات الغيزيدونات. شكل منحنيات الالتصاق بالنسبة لتركيزات منخفضة من جزيئات الغيزيدونات تنتمي إلى نوع لانجمير (Langmuir). أخذت في عين الاعتبار عوامل مختلفة لشرح الفرق في سلوك هذه المواد (التركيبية الكيميائية للمعادن و المحاليل, طبيعة السطح و احتوائه على طبقة غنية بأيونات الفوسفات و الكربونات ذات الحركية العالية).

التحليل الشامل للنتائج التي عثرنا عليها من خلال دراسة مفعول تركيبة المحاليل على التصاق الغيزيدونات و كذلك مفعول الالتصاق على تركيزات أيونات الفوسفات و الكالسيوم يبين على وجود علاقة بين أيونات الفوسفات في المحلول و تلك التي تتواجد على سطح المعادن. هذه الملاحظة تعكس وجود عملية تبادل أيوني بين فوسفونات جزيئات الغيزيدونات و الفوسفات المتواجد على سطح المعادن المدروسة. دراسة المعادن ذات درجة بلورة ضعيفة و في مراحل مختلفة من النضح تؤكد على تواجد ميكانيزم التبادل الأيوني. و مع ذلك, فإن التغيرات الملحوظة في نسب أيونات الكالسيوم خلال عملية الالتصاق يدل على تواجد ظواهر أخرى يجب أخذها بعين الاعتبار. و بالتالي فإن الدراسة التي أنجزت بتواكيز عالية من جزيئات الغيزيدونات تشير إلى وجود ميكانيزمات معقدة على سطح المعادن المدروسة. بالإضافة إلى ذلك فإن الدراسة الشاملة التي أجريناها بتقنيات رامان و التحليل الطيفي بالأشعة ماتحت الحمراء و الرنين المغناطيسي النووي تبين على وجود تفاعلات قوية بين جزيئات الغيزيدونات و مواقع الكالسيوم على سطح المعادن. من جهة أخرى أكدت المقارنة مع أملاح الكالسيوم و الغيزيدونات على احتمال ترسب مواد غير متبلورة تشبه الملح المترسب Ca₂BP.

تطور البلورات النانوية للأباتيت في محاليل الغيزيدونات يعرقل عملية بلورتها و يعيق تطور تركيبة سطحها. بيولوجيا تموقع جزيئات هذا الدواء على سطح النسيج العظمي قد يكون مفيدا إلى حد أن هذه الجزيئات يمكن أن تعرقل عملية شيخوخة العظام و الحفاظ على تفاعليتها. لتقليل الآثار الجانبية لجزيئات البيسفوسفونات من جهة و تحسين التوافر البيولوجي المحلي لهذا الدواء من جهة أخرى, فإن توفيره في الأجزاء المريضة من النسيج العظمي بطريقة مباشرة قد يبدو حلا مثيرا للاهتمام. جميع نتائج هذا العمل قد تشكل قاعدة بيانات مختبرية مهمة لتطوير مواد مكونة من فوسفات الكالسيوم و البيسفوسفونات لإطلاقه بطريقة مباشرة و منظمة في النسيج العظمي.

كلمات مفتاح: التصاق, أباتيت, بيسفوسفونات, تبادل أيوني, نضح, فوسفات الكالسيوم, غيزيدونات.

AVANT PROPOS

Nom et prénom de l'auteur : ERRASSIFI Farid

Intitulé du travail :

Mécanismes d'adsorption du risédronate par des phosphates de calcium biologiques : Applications aux biomatériaux

Encadrant:

- Nom et prénom : **Barroug Allal**
- Grade : **PES**
- Laboratoire et Institution : *Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux et Environnement*

Co-encadrant :

- Nom et prénom : **Legrouri Ahmed**
- Grade : **PES**
- Laboratoire et Institution: *Faculté des Sciences et d'Ingénierie, Université Al Akhawayn, Ifrane*

Laboratoires ou les travaux ont été réalisés:

- Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux et Environnement, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad
- Laboratoire de Phosphates, Pharmacotechnie et Biomatériaux, Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques, Institut Nationale Polytechnique, Toulouse, France.
- -Laboratoire de Transfert de Technologie, Institut Universitaire de Technologie, Castres, France.

Date de commencement du travail : Septembre 2005

Rapporteurs :

- **Zahidi El Mamoune** : PES, Faculté des Sciences, Université Chouaib Doukkali, El Jadida
- **Baçoui Abdelaziz** : PES, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech
- **Lakraimi Mohammed** : PES, Ecole Normale Supérieure, Université Cadi Ayyad, Marrakech

Cadre de coopération: Action intégrée Franco-Marocaine (AI Volubilis MA/05/122).

Principales publications et communications auxquelles ce travail a donné lieu

Publications

1. **Errassifi F.**, Menbaoui A., Autefage H., Benaziz L., Ouizat S., Santran V., Sarda S., Lebugle A., Combes C., Barroug A., Sfihi H., Rey C. *Adsorption on Apatitic Calcium Phosphates. Applications to Drug Delivery. Advances in Bioceramics and Biotechnologies*, Ceramic transactions, Volume 218, pp 159-174, August 2010.
2. Al-Kattan A., **Errassifi F.**, Sautereau A.M., Sarda S., Dufour P., Barroug A., Dos Santos I., Combes C., Grossin D., Rey C., and Drouet C. *Medical Potentialities of Biomimetic Apatites through Adsorption, Ionic Substitution and Mineral/Organic Associations: Three Illustrative Examples*. *Advanced Engineering Materials*, Volume 12, issue 7, pp B224-B233, Juin 2010.
3. **Errassifi F.**, Sarda S., Barroug A., Lebugle A., Legrouri A., Sfihi H A., Rey C. *Adsorption of a bisphosphonate onto apatitic calcium phosphates: Role of surface characteristics*. *Proceeding of the third Conference on the Valorization of Phosphates and Phosphorous compounds (COVAPHOS III)*, Volume 6, pp 153-159, Marrakech 2009.
4. **Errassifi F.**, Barroug A., Sarda S., Rey C., Lebugle A., Legrouri A. *Etude de l'interaction entre le risédronate de sodium avec des phosphates de calcium analogues au minéral osseux*. *Proceeding of the second Conference on the Valorization of Phosphates and Phosphorous compounds (COVAPHOS II)*, Volume 4, pp 239-300, Marrakech 2006.

Communications orales

1. Barroug A., **Errassifi F.**, Menabaoui A., Benaziz L., Legrouri A., Sarda S., Combes C., Rey C., Glimcher J. *Adsorption behaviours onto calcium phosphate and consequences for biomaterials* The third Conference on the Valorization of Phosphates and Phosphorous compounds (COVAPHOS III), 18-20 Mars 2009, Marrakech-Maroc.
2. Sarda S., **Errassifi F.**, Autefage H., Benaziz L., Ouizat S., Santran V., Lebugle A., Combes C., Barroug A., Sfihi H., Rey C. *Adsorption on apatite nanocrystals: Consequences on bone function and applications in biomimetic biomaterials*. *South-West European Conference on Nanoscience and Nanotechnology (NanoSWEC)*, 2-4 November 2009, Bordeaux-France.
3. Rey C., **Errassifi F.**, Menbaoui A., Autefage H., Santran V., Sarda S., Lebugle A., Barroug A., Sfihi H. *Adsorption onto nanocrystalline apatitic calcium phosphates. Applications to growth factors and drugs delivery*. *8th Pacific Rim conference on ceramic and glass technology (PAC RIM8)*, 31May-05 juin 2009, Vancouver-Canada.
4. **Errassifi F.**, Sarda S., Lebugle A., Rey C., Barroug A., Legrouri A. *Bisphosphonate adsorption onto hydroxyapatite crystals as local released biomaterial*. 3rd edition

of the Iberian Biomaterials Congress (SIBB BioBCN), 17-19 September 2008, Barcelona-Espagne.

5. **Errassifi F.**, Sarda S., Barroug A., Lebugle A., Rey C., Legrouri A. *Etude de l'interaction entre bisphosphonates et phosphates de calcium apatitiques. Effets physico-chimiques et conséquences sur le plan biologique.* Journées Jeunes Chercheurs Sociétés Française de Chimie (SFC) -Midi Pyrénées, 10 Avril 2008, Toulouse-France.
6. Barroug A., **Errassifi F.**, Ouizat S., Benaziz L., Legrouri A., Sarda S., Lebugle A., Rey C. *Interaction of biomolecules with calcium phosphates and implications in biomaterials.* 11ème Rencontre Marocaine sur la Chimie de l'Etat Solide (REMCES 11), 16-18 Avril 2009, Kénitra-Maroc.

Communications par affiche

1. Pascaud P., **Errassifi F.**, Sarda S., Barroug A., Legrouri A., Rey C. Nanocrystalline apatite as model of bone mineral for drug delivery: Mechanism of action of bisphosphonates. XXV^{èmes} journées du Groupe Thématique de Recherche sur la Vectorisation (GTRV), 6-8 Décembre 2010, Toulouse-France.
2. **Errassifi F.**, Sarda S., Barroug A., Lebugle A., Legrouri A., Sfihi H., Rey. *Adsorption of bisphosphonate onto apatitic calcium phosphates: Role of surface characteristics.* The third Conference on the Valorization of Phosphates and Phosphorous compounds (COVAPHOS III), 18-20 Mars 2009, Marrakech-Maroc.
3. **Errassifi F.**, Sarda S., Barroug A., Lebugle A., Legrouri A., Sfihi H., Rey. *Nanocrystalline apatite as model of bone mineral. Interaction with bisphosphonates: Risedronate.* South-West European Conference on Nanoscience and Nanotechnology (NanoSWEC), 3-5 November 2008, Bordeaux-France.
4. **Errassifi F.**, Barroug A., Sarda S., Rey C., Lebugle A., Legrouri A. *Etude de l'interaction entre le risédronate de sodium avec des phosphates de calcium analogues au minéral osseux.* The second Conference on the Valorization of Phosphates and Phosphorous compounds (COVAPHOS II), 9-11 Novembre 2006, Marrakech-Maroc.

ABREVIATIONS

Matériaux

ANC: Apatite Nanocristalline Carbonatée

OCPa: Phosphate Octocalcique Apatitique

OCPa-c: Phosphate Octocalcique Apatitique carbonaté

HA: Hydroxyapatite

BPs: Bisphosphonates

BP: Risédronate monosodique

Techniques utilisées

DRX: Diffraction des rayons X

FTIR: Spectroscopie Infrarouge à transformée de fourrier.

Micro Raman: Spectroscopie par diffusion Raman

RMN-MAS: Résonance magnétique nucléaire en phase solide couplée à la rotation à l'angle magique

RMN ³¹P SPE-MAS: impulsion unique du phosphore

RMN ¹H SPE-MAS: impulsion unique du proton

RMN ¹H- ³¹P CP-MAS: Polarisation croisée du proton vers le phosphore

MEB: Microscopie électronique à balayage

MET: Microscopie électronique de transmission

ATG: Analyse thermique gravimétrique

ATD: Analyse thermique différentielle

ICP/OES: Spectrométrie d'émission optique par plasma à couplage inductif

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I	
MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE	
I- APATITES PHOSPHOCALCIQUES BIOLOGIQUES ET SYNTHETIQUES	5
I-1- Tissu osseux	5
I-1-1- Généralités	5
I-1-1-1- Os naturel	5
I-1-1-2- Dent	6
I-1-2- Composition chimique et structure	6
I-1-2-1- Phase minérale	6
I-1-2-2- Phase organique	9
I-1-3- Remodelage osseux	9
I-1-3-1- Cellules osseuses	9
I-1-3-2- Cycle du remodelage osseux	10
I-1-4- Biominéralisation	13
I-1-4-1- Mécanismes	14
I-1-4-2- Rôle du collagène et protéines non-collagéniques dans le processus de biominéralisation	15
I-1-4-3- Précurseur de la biominéralisation	17
I-2- Phosphates de calcium synthétiques	18
I-2-1- Généralités	18
I-2-2- Hydroxyapatite (HA)	21
I-2-3- Apatites non stoechiométriques	22
I-2-3-1- Apatites Nanocristallines Carbonatées (ANC)	23
I-2-3-2- Phosphate Octocalcique Apatitique (OCPa)	24
I-2-3-3- Phosphate Octocalcique Apatitique Carbonaté (OCPa-c)	25
II- OSTÉOPOROSE ET BISPHOSPHONATES	26
II-1- Ostéoporose	26
II-1-1- Définition	26
II-1-2- Traitements médicamenteux	27
II-2- Bisphosphonates	27
II-2-1- Historique	27
II-2-2- Propriétés structurales	28
II-2-3- Mécanismes d'action	30
II-2-3-1- Inhibition de minéralisation (Calcification)	30
II-2-3-2- Résorption osseuse	30
III- ADSORPTION AUX INTERFACES :CAS DU SOLIDE-LIQUIDE	32
III-1- Enjeu de l'étude des processus d'adsorption	32
III-2- Adsorption	32
III-2-1- Lois d'adsorption	33
III-2-1-1- Isotherme de Gibbs	33
III-2-1-2- Isotherme de Langmuir	34

III-2-1-3- Isotherme de Freundlich	34
III-2-1-4- Isothermes de Langmuir-Freundlich et Tòth	35
III-2-1-5- Isotherme BET	35
III-3- Eude expérimentale d'adsorption	36
III-3-1- Cinétique d'adsorption	36
III-3-2- Isothermes d'adsorption	37
III-3-3- Réversibilité du processus	37
III-3-4- Paramètres impliqués dans le processus d'adsorption	39
III-3-4-1- Influence du pH	39
III-3-4-2- Influence de la force ionique	39
III-3-4-3- Influence de la teneur en ions minéraux	40
III-3-4-4- Influence de la température	41
III-3-4-5- Influence des propriétés physico-chimiques du support	42
III-3-5- Mécanismes d'adsorption	43

Chapitre II

SYNTHESE ET CARACTERISATION DE PHOSPHATES DE CALCIUM & DE SELS DE RISEDRONATE DE CALCIUM

Partie A

SYNTHESE ET CARACTERISATION DE PHOSPHATES DE CALCIUM

I- INTRODUCTION	45
II- HYDROXYAPATITE STOECHIMETRIQUE	47
II-1- Synthèse	47
II-2- Caractérisation	47
II-2-1- Diffraction des rayons X	47
II-2-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF)	48
II-2-3- Spectrométrie par diffusion Raman	51
II-2-4- Spectroscopie RMN de l'état solide	51
II-2-5- Analyse chimique et surface spécifique	51
III- APATITES NANOCRISTALLINES CARBONATEES (ANC)	53
III-1- Synthèse	53
III-2- Caractérisation	53
III-2-1- Diffraction des rayons X	53
III-2-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier	55
III-2-3- Spectrométrie par diffusion Raman	61
III-2-4- Spectroscopie RMN de l'état solide	62
III-2-5- Analyse chimique et surface spécifique	67

IV- PHOSPHATES OCTOCALCIQUES	69
IV-1- Synthèse	69
IV-1-1- Phosphate Octocalcique Apatitique (OCPa)	69
IV-1-2- Phosphate Octocalcique Apatitique Carbonaté (OCPa-c)	69
IV-2- Caractérisation	70
IV-2-1- Diffraction des rayons X	70
IV-2-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier	71
IV-2-3- Spectrométrie par diffusion Raman	71
IV-2-4- Analyse chimique et surface spécifique	71
V- CONCLUSION	71

Partie B

ELABORATION ET CARACTERISATION DE SELS DE RISEDRONATE DE CALCIUM

I- INTRODUCTION	77
II- PREPARATION DES SELS DE RISEDRONATE DE CALCIUM	79
II-1- Généralités sur le risédronate monosodique	79
II-1-1- Présentation	79
II-1-2- Analyses thermo-gravimétriques (ATD/ATG)	79
II-1-3- Diagramme de spéciation	80
II-1-4- Spectroscopie UV-Visible	82
II-2- Synthèse et caractérisation de sels de risédronate de calcium	83
II-2-1- Synthèse	83
II-2-2- Caractérisation	84
II-2-2-1- Diffraction des rayons X	84
II-2-2-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier	86
II-2-2-3- Spectrométrie par diffusion Raman	88
II-2-2-4- Spectroscopie RMN de l'état solide	91
II-2-2-5- Microscopie électronique à balayage (MEB)	92
II-2-2-6- Analyses chimiques	94
II-3- Etude complexométrique	95
II-3-1- Etude par conductimétrie	95
II-3-2- Caractérisations du précipité obtenu	96
III- DISCUSSION	100
IV- CONCLUSION	102

Chapitre III

ADSORPTION DU RISEDRONATE PAR L'HYDROXYAPATITE

I- INTRODUCTION	103
II- ADSORPTION DU RISEDRONATE PAR L'HYDROXYAPATITE	104
II-1- Matériaux et méthodes	104
II-1-1- Protocole expérimental	104
II-1-2- Adsorbant et adsorbat	104
II-1-3- Adsorption	104
II-1-4- Réversibilité	105
II-1-5- Etude de libération	105
II-1-6- Analyse chimique	106
II-2- Résultats	106
II-2-1- Cinétique d'adsorption	106
II-2-2- Isotherme d'adsorption	107
II-2-3- Réversibilité du processus	111
II-2-4- Libération du risédronate	113
II-2-5- Influence de la composition chimique du milieu sur l'adsorption	116
II-2-5-1- Influence du pH	116
II-2-5-2- Influence des ions phosphate	116
II-2-5-3- Influence des ions calcium	121
II-2-6- Influence de l'adsorption sur la composition du milieu	123
II-2-7- Adsorption du risédronate à partir de solutions concentrées	126
II-2-7-1- Isotherme d'adsorption	126
II-2-7-2- Influence de l'adsorption sur la composition du milieu.	129
II-3- Caractérisation du support après adsorption	131
II-3-1- Conditions expérimentales	131
II-3-2- Résultats	131
II-3-2-1- Diffraction des rayons X	131
II-3-2-2- Spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier	133
II-3-2-3- Spectrométrie par diffusion Raman	133
II-3-2-4- Spectroscopie RMN de l'état solide	134
II-3-2-5- Analyse chimique	135
III- DISCUSSION	140
IV- CONCLUSION	149

Chapitre IV

ADSORPTION DU RISEDRONATE PAR LES APATITES DE BASSE CRISTALLINITE

I- INTRODUCTION	150
II- ADSORPTION DU RISEDRONATE PAR LES APATITES NANOCRISTALLINES CARBONATEES	151
II-1- Matériaux et méthodes	151
II-1-1- Adsorption	151
II-1-2- Réversibilité	151
II-1-3- Analyses chimiques	151
II-1-4- Caractérisation du support après adsorption	152
II-1-5- Evolution des supports ANC en présence de risédronate	152
II-2- Résultats	152
II-2-1- Cinétique d'adsorption	152
II-2-2- Isotherme d'adsorption	153
II-2-3- Réversibilité	153
II-2-4- Influence de l'adsorption sur la composition du milieu	157
II-3- Caractérisation du support après adsorption	160
II-3-1- Diffraction des rayons X	160
II-3-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier	160
II-3-4- Spectrométrie par diffusion Raman	163
II-3-5- Spectroscopie RMN de l'état solide	163
II-3-6- Analyses thermogravimétrique et différentielle	164
II-3-7- Microscopie électronique à transmission (MET)	170
II-4- Evolution des supports ANC en présence de risédronate	172
II-4-1- Résultats	172
II-4-1-1- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier	172
II-4-1-2- Spectrométrie par diffusion Raman	179
III- ADSORPTION DU RISEDRONATE PAR LES APATITES OCTOCALCIQUES	182
III-1- Matériaux et méthodes	182
III-1-1- Adsorption	182
III-2- Résultats	182
III-2-1- Cinétique d'adsorption	182
III-2-2- Isotherme d'adsorption	184
III-2-3- Influence de l'adsorption sur la composition du milieu	184
III-3- Caractérisation du support après adsorption	189
III-3-1- Conditions expérimentales	189
III-3-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier	189
III-3-3- Spectrométrie par diffusion Raman	189

IV- DISCUSSION	192
V- INTERACTION PHOSPHATES DE CALCIUM-BISPHOSPHONATES & CONSEQUENCES BIOLOGIQUES	204
VI- CONCLUSION	208
CONCLUSION GENERALE	209
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	212
ANNEXES	232

INTRODUCTION GENERALE

Les processus d'adsorption qui interviennent aux interfaces entre phosphates de calcium et molécules biologiques sont impliqués dans de nombreux domaines. En biologie, ces processus semblent contrôler et réguler les phénomènes de biominéralisation (Glimcher, 1989; Boskey, 1998). En médecine, les phénomènes de surface des apatites phosphocalciques sont à la base de la conception des substituts osseux et des biomatériaux vecteurs de médicaments (Shinto et al., 1992; Aoki 1994; Pham et al., 2002; Barroug et al., 2004; Billon-Chabaud et al., 2008; Zayane, 2010). Les propriétés d'adsorption de ces matériaux sont également d'usage en chimie analytique, notamment dans la séparation et la purification de molécules organiques par chromatographie en phase liquide (Gorbunoff, 1984; Kawazaki, 1991). Ces phénomènes sont aussi observés dans la fabrication de produits pharmaceutiques, de dentifrice, de fertilisants ou de détergents.

Dans les milieux vivants, les phosphates de calcium apatitiques jouent un rôle crucial dans les processus biologiques. Ils constituent la phase minérale des tissus calcifiés (os et dents) et contribuent par conséquent aux fonctions vitales de l'organisme (LeGeros, 1991). Ainsi, ils assurent la rigidité du matériau permettant aux tissus de jouer leurs fonctions de soutien et de protection et sont également impliqués dans le processus de régulation de la teneur en ions minéraux des fluides biologiques (Glimcher, 1992). Ils sont associés, en outre, à diverses macromolécules organiques (collagène et protéines non-collagéniques) de manière à former un composite minéral-organique résistant et autoréparable (Glimcher, 1984; LeGeros, 1991; Boskey, 1998).

Le minéral osseux est composé de fines plaquettes d'apatite de taille nanométrique qui se déposent parallèlement aux fibres de collagène (Kuhn et al. 2008). Longtemps assimilé à une hydroxyapatite substituée, le minéral osseux correspond en fait à une apatite carbonatée déficiente en ions calcium et hydroxyde. Sa composition peut varier considérablement selon la nature du tissu, l'âge des individus (Legros, 1984), le régime alimentaire (Grynepas et Rey, 1992) et les maladies (Harrison et al., 1980; Pettifor et al., 1984).

Une caractéristique majeure des apatites biologiques est la présence d'environnements ioniques qui n'existent pas dans les apatites bien cristallisées. Ces environnements ont été attribués (Rey et al., 1989a; Eichert et al. 2002) à la présence en surface des cristaux d'une couche hydratée bien organisée, mais labile, contenant des ions minéraux (environnements des ions CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} notamment). Cette couche hydratée, qui évolue au cours du temps, serait responsable de la très grande réactivité de surface des apatites biologiques. Ces apatites présentent de très fortes capacités d'échanges ioniques et d'adsorption, ce qui leur permet d'interagir facilement avec les fluides biologiques. Ces propriétés pourraient être liées à la

présence de cette couche hydratée, qui contient des espèces ioniques relativement mobiles et facilement échangeables (Ouizat et al., 1999; Cazalbou, 2000; Rey et al., 2007b; Barroug et al., 2008;).

Par ailleurs, les dimensions nanométriques des cristaux (à l'exception toutefois des cristaux de l'émail dentaire) ainsi que leur étroite association avec la matrice organique, rendent l'étude directe sur ces composites difficile et ouvrent la voie à des interprétations faiblement étayées. La plupart des progrès réalisés dans la connaissance des minéralisations biologiques ont eu pour moteur l'étude de composés de synthèse modèles. Ces composés se révèlent en outre nécessaires pour acquérir une meilleure connaissance des mécanismes qui gouvernent les interactions impliquant le minéral osseux et le milieu environnant.

Les apatites de synthèse se sont imposées depuis une vingtaine d'années dans l'élaboration de biomatériaux (Heughebaert et al., 1988; LeGeros, 1991; Aoki, 1994; Rey et al., 2007b), en raison de leurs propriétés particulières de bioactivité et d'ostéoconduction (aptitude de faciliter la repousse osseuse et l'intégration aux tissus osseux). Ce type de réactivité implique la formation d'une couche de phosphate de calcium analogue au minéral osseux à la surface du biomatériaux en contact des fluides biologiques (Rey et al., 1995a). La grande réactivité de ces cristaux néoformés, leur permet de fixer des protéines favorisant l'adhésion et l'expression des cellules ostéoblastes, responsables de la construction osseuse. Cependant, cette néoformation est défavorable dans les environnements atteints d'affections osseuses (ostéoporose, tumeurs osseuses, ostéomyélite...) qui représentent la majorité des besoins réels de recapitalisation osseuse.

En effet, ces situations pathologiques semblent affecter les performances de l'implant phosphocalciques en termes de substitution et/ou processus de résorption osseuse (Verron, et al., 2010). Aujourd'hui, diverses études ont été engagées dans le développement de systèmes mixtes combinant substituts osseux et molécules thérapeutiques (facteurs de croissance, antibiotiques, anticancéreux...). Cette nouvelle génération de biomatériaux phosphocalciques vecteurs d'agents thérapeutiques vise, d'une part, à améliorer le potentiel ostéogénique des substituts osseux dans les sites sains de l'os (*ossification, repousse osseuse*) et, d'autre part, à traiter localement les maladies osseuses (Itokazu et al., 1995; Pham et al., 2002; Krisanapiboon et al., 2006; Vechasilp, 2007; Zayane,2010). Les systèmes de libération locale vont permettre en outre une amélioration de la biodisponibilité d'agents thérapeutiques et diminuer leurs effets indésirables induits par le traitement systémique.

Parmi les maladies osseuses qui ont suscité un grand intérêt des scientifiques ces dernières années, l'ostéoporose est d'importance épidémiologique considérable,

dont l'incidence augmente avec l'âge (Meunier et al., 1999). Cette maladie se caractérise par une baisse de la masse osseuse et une dégradation de son architecture, ce qui entraîne un risque important de fractures chez les patients atteints. Cette pathologie est induite par un déséquilibre cellulaire dans le remodelage osseux dû à un surcroît d'activité des ostéoclastes (cellules qui résorbent l'os) par rapport aux ostéoblastes (cellules qui reconstruisent l'os). Actuellement, selon le groupe de recherche et d'information sur l'ostéoporose, 4 millions de personnes souffrent de cette maladie en France dont 70 % de femmes à 80 ans. Avec l'accroissement de l'espérance de vie, l'ostéoporose est devenue un problème majeur de santé publique et de nombreuses recherches ont été entreprises pour y remédier. La voie habituellement utilisée pour ralentir la dégradation de la matière osseuse consiste donc à diminuer l'activité des ostéoclastes. Divers principes actifs de la famille de bisphosphonates ont montré un pouvoir inhibiteur de l'activité ostéoclastique (Fleisch, 1998; Russell et Rogers, 1999; Fleisch, 2003).

Les bisphosphonates utilisées à ce jour pour le traitement de lésions osseuses sont utilisés par voie systémique et génèrent de ce fait quelques effets secondaires indésirables. Ils peuvent provoquer des troubles rénaux lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse, et des troubles du système digestif (oesophagites, ulcères) lorsqu'ils sont administrés par voie orale (Thiebaud et al., 1994; Lin, 1996). Une faible biodisponibilité est également un autre inconvénient de l'administration par voie orale. Dans ce cadre plusieurs recherches se sont concentrées sur la mise au point d'un dispositif de libération locale de bisphosphonates par des biomatériaux phosphocalciques (Seshima et al., 2006; Billon-Chabaud et al., 2008 et 2010; Jindong et al., 2010).

Par ailleurs, les recherches concernant l'adsorption par les apatites de principes actifs, et plus particulièrement les bisphosphonates, se sont considérablement développées ces dernières années en raison, d'une part, de l'intérêt de ces phénomènes dans le développement de nouvelles générations de biomatériaux vecteurs d'agents thérapeutiques et, d'autre part, de leur utilisation en tant que marqueurs du squelette en médecine nucléaire après association aux éléments radioactifs (scintigraphie gamma). La plupart de ces études ont généralement porté sur des apatites bien cristallisées (Claessens et Kolar, 1999; Grossmann et al., 2000; Josse et al., 2005; Nancollas et al., 2006; Cukrowski et al., 2007; Vitha et al., 2008; Rill et al., 2009). Cependant, peu d'études ont été consacrées aux apatites nanocristallines analogues au minéral osseux (Palazzo et al., 2007). De plus, aucune étude systématique à notre connaissance n'a été engagée sur l'interaction de molécules de bisphosphonates avec des apatites mal cristallisées en milieu aqueux.

Malgré les intenses investigations menées sur les propriétés de surface d'apatites de synthèse, les phénomènes à l'interface entre minéral osseux et bisphosphonates ainsi que leur mode d'action physico-chimique restent relativement méconnus et toujours mal élucidés. Le présent travail a pour but d'examiner les processus d'adsorption et de désorption du risédronate, un agent thérapeutique de la famille des bisphosphonates, par des apatites phosphocalciques de synthèse rencontrées dans les milieux biologiques. Ce médicament est actuellement commercialisé sous le nom de « Actonel », et est préconisé pour le traitement de certaines affections du tissu osseux telle l'ostéoporose. Les adsorbants examinés présentent différentes caractéristiques physico-chimiques. Il s'agit (i) d'une hydroxyapatite stoechiométrique considérée comme prototype minéral des os et des dents et est utilisée dans l'élaboration de biomatériaux, (ii) d'apatites nanocristallines carbonatées de structure et composition similaire au minéral osseux et (iii) de phosphates octocalciques apatitiques.

Le premier chapitre de ce mémoire traitera des généralités sur les phosphates de calcium naturels et synthétiques, l'ostéoporose et les bisphosphonates. Nous avons également présenté un aperçu sur le processus d'adsorption et les travaux réalisés sur la réactivité de surface des apatites. Le deuxième chapitre fera l'objet de synthèse et caractérisation des divers phosphates de calcium utilisés comme adsorbants et également des sels de risédronate de calcium susceptibles de se former en solution lors d'interaction de l'adsorbat en présence d'ions calcium. Le troisième chapitre portera sur l'étude détaillée d'adsorption et de désorption du risédronate par l'hydroxyapatite. Le quatrième chapitre présentera les résultats d'adsorption du bisphosphonate étudié par les apatites nanocristallines carbonatées et les phosphates octocalciques apatitiques.

Chapitre I

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

I- APATITES PHOSPHOCALCIQUES BIOLOGIQUES ET SYNTHETIQUES

I-1- Tissu osseux

I-1-1- Généralités

L'os est un tissu conjonctif qui constitue avec le cartilage, le squelette. Celui-ci, assure deux grands rôles dans l'organisme. D'une part, il doit, pour assurer ses fonctions mécaniques et protectrices, constituer une structure rigide et mobile sur laquelle repose organes vitaux et autres tissus mous; d'autre part, il participe, en plus de la formation des cellules sanguines, au maintien de l'équilibre phosphocalcique et d'autres espèces qui entrent dans sa composition (Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-}). Ainsi, il a été établi que les ions carbonate associés à l'os interviennent dans la régulation du pH des liquides biologiques (Legros, 1984).

Le tissu osseux est assimilable à un matériau composite constitué principalement de fibres organiques, le collagène, inscrites dans une matrice minérale (Glimcher, 1989; Einhorn, 1996). La répartition massique des deux phases dans le tissu est variable suivant la partie du corps considérée. Ainsi, on peut distinguer deux types de tissus osseux: l'os et la dent.

I-1-1-1- Os naturel

L'os est considéré comme une association fonctionnelle et biologique de plusieurs tissus. Il est constitué d'une fraction organique (23 % de la masse sèche) et d'une fraction minérale (65 % de la masse sèche) auxquelles s'ajoute la contribution de l'eau (12 %) (LeGeros, 1981).

On distingue deux types d'os (Figure I-1):

- **Os compact** (os cortical ou Haversien): dur et dense, il constitue la coque externe des os et comprend des ostéons. Ces derniers sont des canaux neurovasculaires dont la paroi est formée de plusieurs couches concentriques de fibres de collagènes sur lesquelles se développent les cristaux d'apatites. L'os cortical représente 80 % de la masse osseuse chez l'adulte (surface d'échange de $3,5 \text{ m}^2$), mais de part sa structure dense et compacte, il n'intervient que très peu dans les échanges métaboliques.

- **Os spongieux** (os trabéculaire): résistant aux contraintes de flexion, de traction, de compression et de cisaillement, il s'appuie sur l'os compact auquel il transmet les forces. Il occupe la part la plus volumineuse du tissu mais ne représente que 20% de sa masse, soit une surface d'échange métabolique de 7 m^2 . A l'échelle cellulaire, l'os trabéculaire renferme différents types de cellules responsables du remodelage osseux: ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes.

I-1-1-2- Dent

Les dents sont constituées essentiellement de deux tissus osseux distincts: l'émail et la dentine (Figure I-2). Ces deux tissus entourent la pulpe dentaire qui est logée dans la chambre pulpaire au niveau de la couronne et dans les canaux radiculaires au niveau des racines.

L'émail dentaire recouvre la dentine au niveau de la couronne. C'est le tissu le plus dur de l'organisme, et ne contient que 0,5 % en masse de phase organique et 2 % d'eau. Il offre à la dent ses propriétés mécaniques (dureté) et augmente sa résistance à l'abrasion et aux attaques acides. Contrairement à tous les autres tissus osseux, l'émail ne contient pas de collagène et ne se régénère pas une fois endommagé.

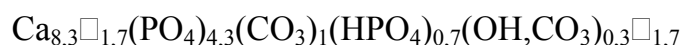
La dentine (ou ivoire) est recouverte de la couronne (partie visible de la dent) par l'émail, et au niveau des racines par le ciment (tissus d'origine osseuse). Elle se compose en masse de 75 % de phase minérale, de 20 % de phase organique et de 5 % d'eau. C'est le deuxième tissu le plus dur de l'organisme.

I-1-2- Compositions chimiques et structure

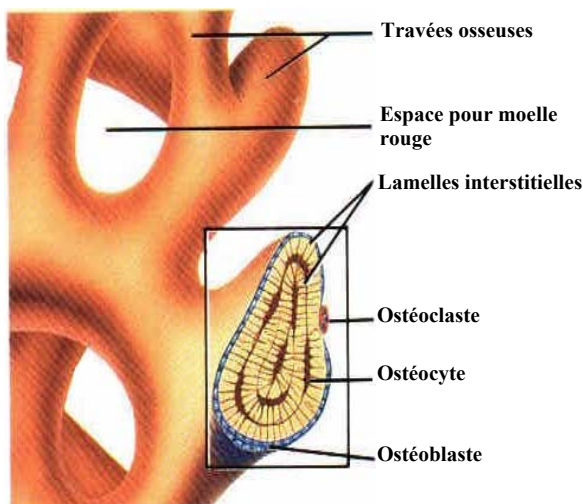
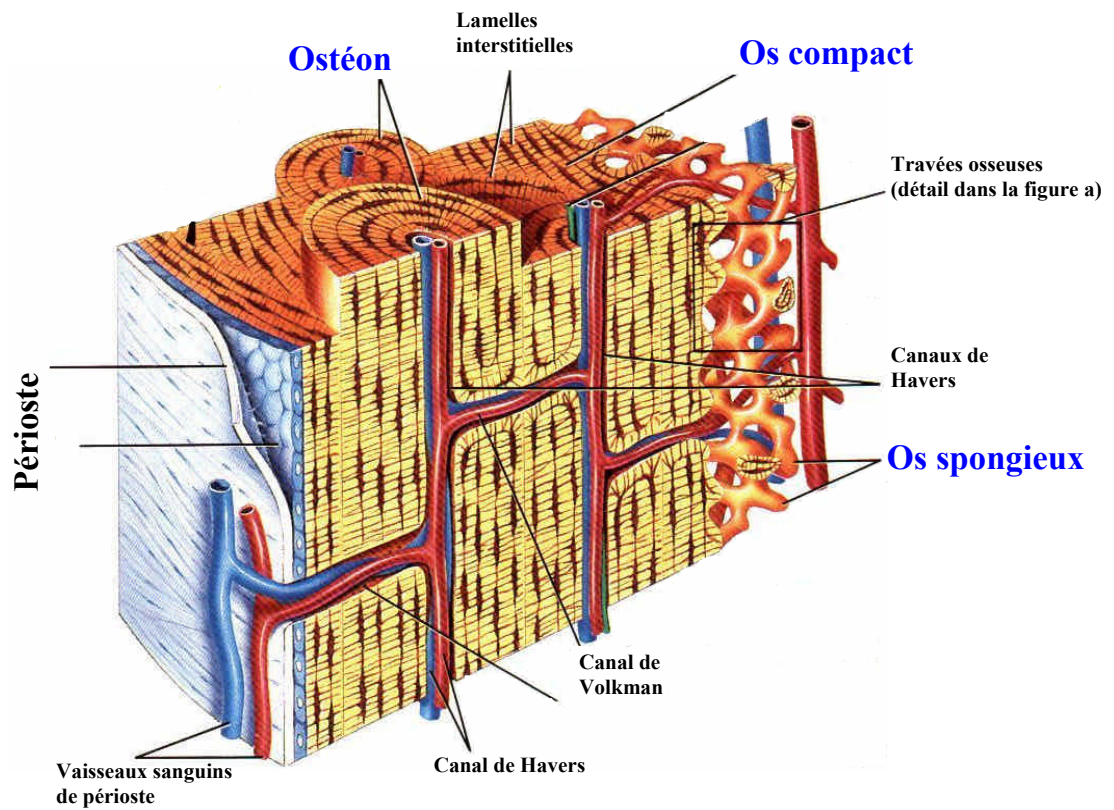
I-1-2-1- Phase minérale

La fraction minérale des tissus calcifiés (os et dents) est essentiellement constituée de phosphate et de calcium, associés à des groupements carbonates (Tableau I-1); à ces constituants majeurs s'ajoutent d'autres éléments minéraux importants mais en faible proportion (magnésium, sodium, potassium, chlore, fluor,...) ou à l'état de trace (strontium, plomb, zinc,...) (LeGeros, 1991; Elliott, 1994). Cependant, comme le mettent en évidence les données présentées dans le tableau I-1, chaque tissu possède sa propre composition chimique et celle ci peut évoluer au sein d'un même tissu. Il a également été montré que les différents teneurs ioniques au sein des tissus osseux évoluent selon l'âge du sujet (Legros, 1984).

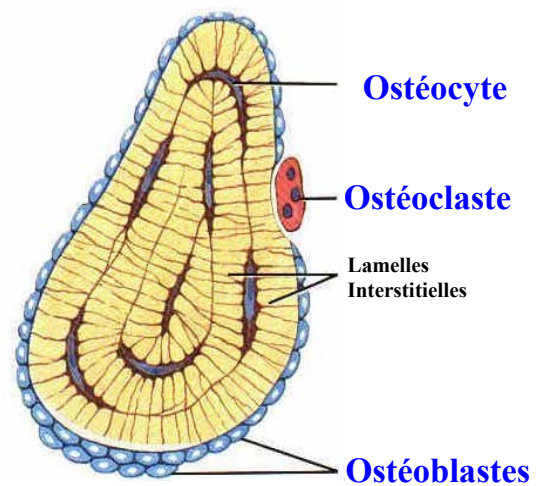
Le constituant minéral des tissus calcifiés est comparable à une apatite phosphocalcique carbonatée plus au moins lacunaire et mal cristallisée, comparée à l'hydroxyapatite (Legros et al., 1986); si l'on considère uniquement les éléments majeurs, on établit une formule chimique décrivant l'os comme une apatite déficiente de type AB.



Avec l'âge, le rapport $\text{CO}_3^{2-} / \text{HPO}_4^{2-}$ augmente sensiblement mais le minéral reste très lacunaire.



(a) : Agrandissement de travées d'os spongieux



(b) : Détails d'une coupe de travée osseuse

Figure I-1: Schéma de l'os cortical et spongieux

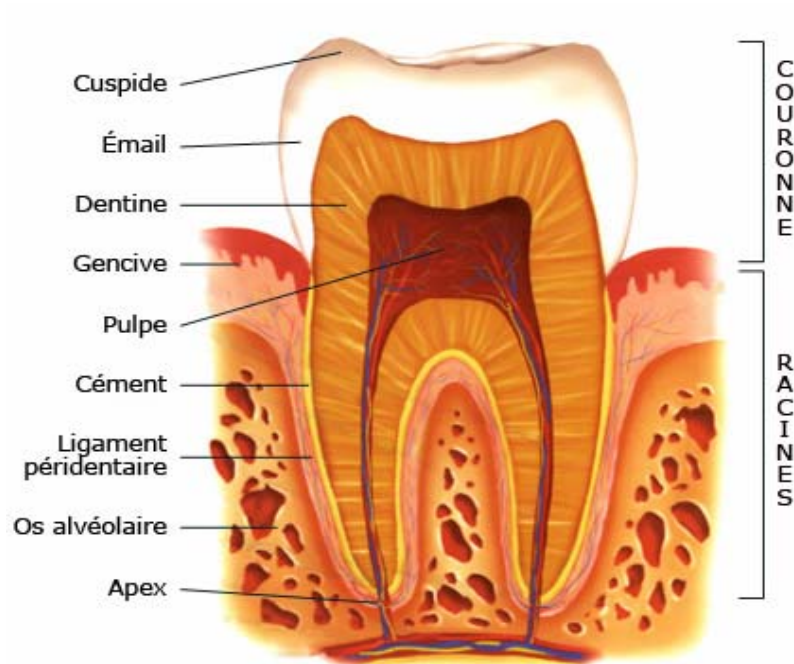


Figure I-2: Coupe transversale schématique d'une dent

Tableau I-1: Composition chimique (% massique) de la phase minérale de l'émail, de la dentine et de l'os (Elliot, 1994).

Elément	Os	Email	Dentine
Ca	36,60	37,60	40,30
P	17,10	18,30	18,60
CO ₃	4,80	3,00	4,80
Na	1,00	0,70	0,10
K	0,07	0,05	0,07
Mg	0,60	0,20	1,10
Sr	0,05	0,03	0,04
Cl	0,10	0,40	0,27
F	0,10	0,01	0,07
Ca/P	1,65	1,59	1,67

I-1-2-2- Phase organique

L'os contient différentes structures organiques intervenant dans son poids sec déminéralisé. Le collagène de type I y prédomine très nettement, suivi d'une proportion beaucoup plus faible de collagène de type V et de protéines non collagéniques telles les protéoglycanes et les ostéocalcines (Glimcher, 1989; Boskey et al., 1989a).

Le collagène de type I comporte deux chaînes α_1 et une chaîne α_2 , de compositions légèrement différentes en acides aminés, organisées en triple hélice. Ces chaînes sont très riches en glycine (environ un tiers), de proline, d'hydroxyproline et d'hydroxylysine (Legros, 1984). Ces acides aminés confèrent une orientation particulière à la chaîne polypeptidique et lui assure sa rigidité.

La synthèse du collagène de type I constitue la première étape de la formation du tissu supportant la minéralisation par étapes successives. Les fibres de collagène subissent au niveau de l'os un processus continu de synthèse et de dégradation intervenant dans le cycle de remodelage du tissu.

I-1-3- Remodelage osseux

I-1-3-1- Cellules osseuses

Au niveau cellulaire, l'os contient différents types de cellules:

Les ostéoblastes (Figure I-3-a): ce sont des cellules osseuses immatures, responsables de la synthèse d'une substance appelée ostéoïde, substance organique qui va ensuite se minéraliser rapidement en emprisonnant les ostéoblastes pour former l'os. Ils sont situés à la surface des travées osseuses et dans les lacunes de résorption de l'os compact. Leur rôle est de synthétiser les éléments de la matrice osseuse et de permettre sa calcification.

Les ostéocytes (Figure I-3-b): ce sont des ostéoblastes qui ont été progressivement emprisonnés par la matrice qu'ils ont élaboré. Elles sont enfermées dans une petite cavité, l'ostéoplaste, et communiquent avec les ostéocytes voisins par de fins prolongements cytoplasmiques. Ils détectent les tensions mécaniques au sein de l'os et participent au remodelage osseux.

Les ostéoclastes (Figure I-3-c): ce sont des cellules multinucléées issues de monocytes en circulation (type de globule blanc). Ils opèrent à des pH acides (Figure I-3-d), ce qui entraîne d'une part une solubilisation du minéral (résorption osseuse), et d'autre part l'activation d'enzymes lysosomiales qui dégradent la matrice organique.

I-1-3-2- Cycle du remodelage osseux

En tant que structure adaptée, adaptable et optimisée, l'architecture osseuse est continuellement régénérée par formation (apposition) et résorption locale d'os: c'est le remodelage osseux. Ces processus de formation et de résorption sont couplés et synchronisés par l'intermédiaire de paquets d'ostéoblastes et d'ostéoclastes couramment appelés unité de remodelage. La figure I-4 présente le cycle fonctionnel simplifié du remodelage osseux. Ce processus se déroule en cinq étapes:

Phase d'activation: le long de la surface osseuse inactive recouverte de cellules bordantes, ou ostéoblastes quiescents, surviennent les précurseurs mononucléés des ostéoclastes.

Phase de résorption: les ostéoclastes dissolvent puis endocytent (inclusion cellulaire) le tissu osseux et creusent des lacunes de résorption.

Phase d'inversion: les ostéoclastes ayant terminé de former les lacunes subissent une apoptose et sont remplacées par les cellules mononucléées précurseurs ostéoblastiques.

Phase de formation: les ostéoblastes comblerent les cavités en apposant une nouvelle matrice osseuse.

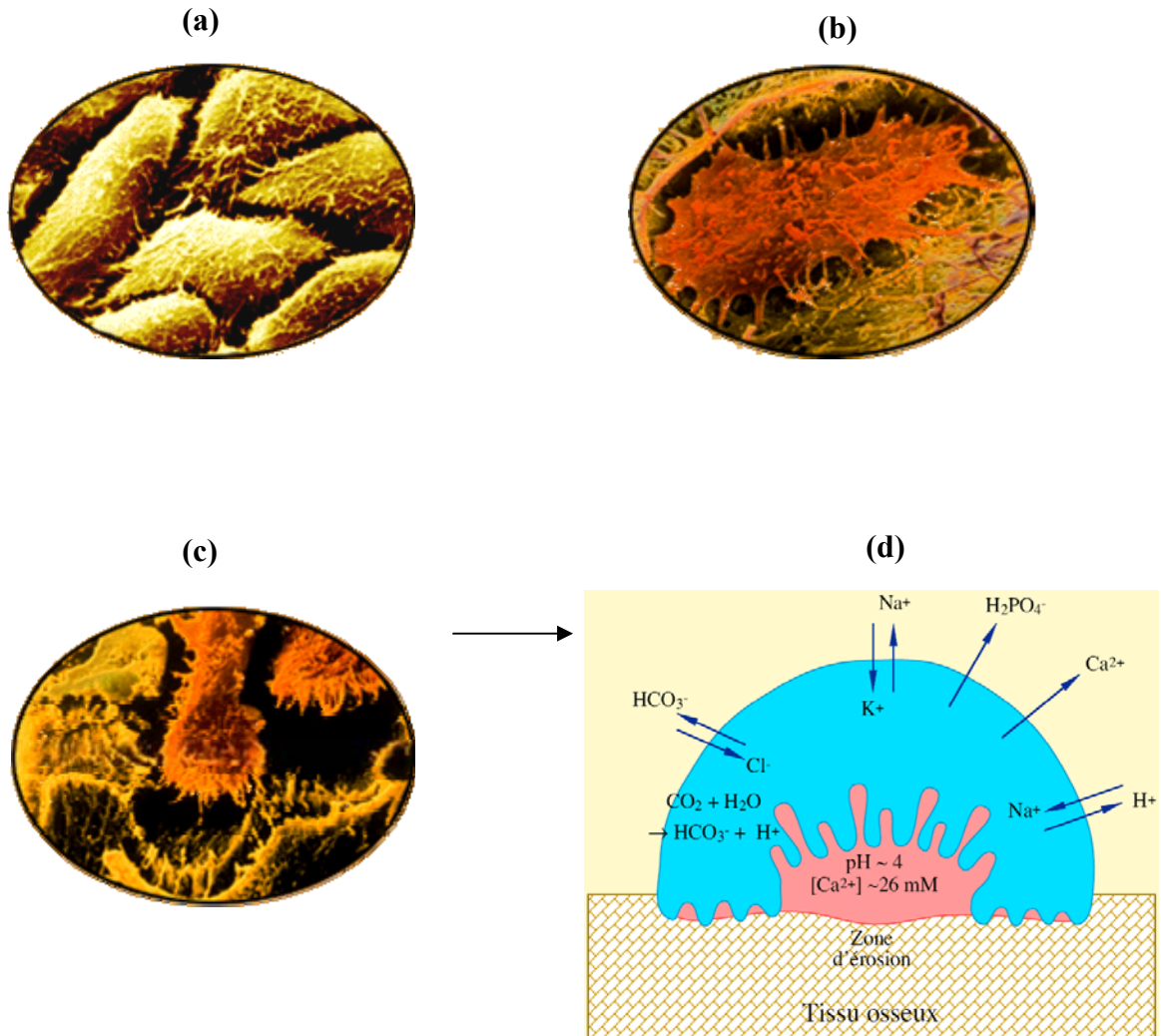


Figure I-3: (a) tapis d'ostéoblastes, (b) Ostéocyte dans la matrice osseuse, (c) ostéoclaste creusant une lacune, (d) schéma d'un ostéoclaste opérant à pH acide.

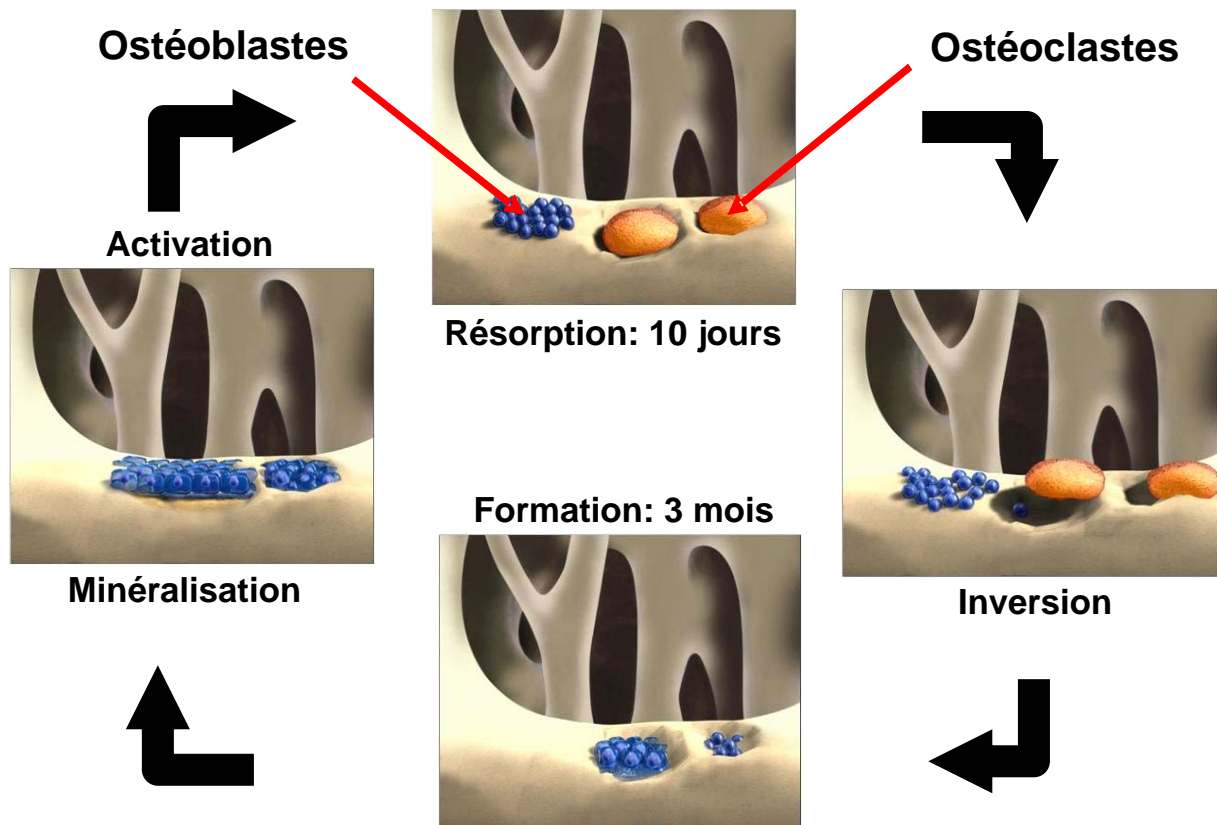


Figure I-4: Remodelage osseux

I-1-4- Biominéralisation

La biominéralisation est le processus par lequel les cristaux minéraux sont déposés d'une façon organisée au sein de la matrice extra et intracellulaire (Boskey, 1998). Ce processus est à l'origine d'une nucléation hétérogène de phosphate de calcium, suivie d'une étape de croissance cristalline. D'une façon simplifiée, la formation du tissu osseux minéralisé peut être effectuée en deux temps:

- Synthèse et sécrétion d'une matrice organique (substance pré-osseuse) par des cellules spécialisées (ostéoblastes); ceci correspond à la matrice extracellulaire (MEC) dont les principaux constituants sont regroupés dans le tableau I-2 (Ea, 2007).

- Minéralisation de la MEC pour former des structures extrêmement dures (os et dents).

Tableau I-2: Eléments de la matrice extracellulaire intervenant dans la minéralisation

Pro-minéralisants	Inhibiteurs
Vésicules matricielles	Pyrophosphates
Corps apoptotiques	Gla protéines matricielles
Calcium et phosphate	Ostéopontine
Phosphatases alcalines	Ostéocalcine
Pyrophosphatases	Eau
Glycoprotéines	Protéoglycanes
Annexines	Protéine ANK (transporteur des PP)
Collagènes I, II et X	
Métalloprotéases	

Cependant, les mécanismes de minéralisation de la matrice organique ne sont toujours pas entièrement élucidés malgré d'innombrables travaux sur ce sujet. Dans quels sites débute la minéralisation? Quels sont les mécanismes mis en jeu? Quelle est la nature physico-chimique de la phase minérale? Telles sont les grandes questions qui sont largement débattues depuis de nombreuses années et sur lesquelles nous allons faire le point de façon succincte.

I-1-4-1- Mécanismes

Les fluides biologiques comportent une certaine proportion d'ions calcium et phosphate. Cette solution est métastable ne favorisant pas ainsi une précipitation spontanée des ions en solution vers une phase solide. L'organisme est donc obligé d'avoir recours à la nucléation hétérogène. Des sites particuliers de la phase organique (vésicules, fibrilles de collagène ou autres) sont utilisés comme initiateurs de cette précipitation; des facteurs biologiques ainsi que des réactions biochimiques interviennent également dans le processus (Boskey, 1989b). Ainsi, la minéralisation ne débute qu'à des endroits définis, même si certaines conditions physico-chimiques sont remplies dans d'autres sites (Glimcher, 1989).

La multiplicité des sites et des mécanismes de minéralisation rend l'étude de ce phénomène assez complexe. Il a été établi à l'issue de nombreuses recherches (Boskey, 1998; Olszta et al., 2007) que le processus de minéralisation ne peut être généralisé, et que selon chaque type de tissus prédomine tel ou tel mode de formation.

Ainsi, la calcification du cartilage débute à l'intérieur des poches appelées vésicules matricielles (VM) (Ozawa et al., 2008). Celles ci sont de petite taille (0,1 à 0,2 μm) délimitées par une membrane trilaminaire typique. Elles renferment diverses protéines (lipides) et une variété d'enzymes (phosphatases alcalines, pyrophosphatases, peptidases neutres et protéases). Les vésicules constituent un microenvironnement dans lequel les ions calcium et phosphate vont être concentrés, et former avec les phospholipides des complexes ternaires capables d'initier la minéralisation (Wu et al., 1997). La première phase de la minéralisation (initiation) se produit lorsque la concentration intravésiculaire des sels de phosphate de calcium dépasse son seuil de saturation (Anderson, 1995). Ces foyers de nucléation primaire vont alors croître et rompre la membrane des VM puis être déversés dans le milieu extracellulaire pour servir de foyers secondaires et permettre la propagation de la minéralisation. Celle-ci est régulée par les composants de la matrice extracellulaire, notamment les pyrophosphates et les protéines non-collagéniques, qui peuvent l'accélérer ou la retarder. Notons que ces vésicules ne se trouvent pas dans l'émail et la dentine.

Pour le tissu osseux c'est plutôt les fibrilles du collagène qui sont fortement considérés comme sites privilégiés d'initiation de la minéralisation. Parfois, les deux mécanismes (VM, fibrilles de collagène) fonctionnent simultanément (Boskey, 1998). De nombreux travaux suggèrent que les stades précoces de la minéralisation (formation des premiers dépôts minéraux) se déroulent au sein des bandes à trous des fibrilles de collagène (Glimcher, 1987; Hodge, 1989). Cette partie est moins riche en acides aminés du fait du décalage des chaînes les unes par rapport aux autres. Ces

trous agissent comme étant des compartiments permettant l'accumulation des ions calcium et phosphate et la précipitation sous la forme d'un dépôt minéral.

Peu à peu, les cristaux vont envahir les trous puis les espaces longitudinaux pour finir par recouvrir entièrement les fibrilles de collagène.

I-1-4-2- Rôle du collagène et protéines non-collagéniques dans le processus de biominéralisation

Le rôle important du collagène dans l'initiation de la minéralisation physiologique a été discuté dans plusieurs études. Glimcher (1989) a noté lors d'une étude *in vitro* que le collagène hautement purifié (déprotéiné) peut nucléer les cristaux de phosphate de calcium à partir d'une solution métastable d'ion calcium et phosphate (solution ne produisant pas de nucléation spontanée). Les résultats issus de cette recherche indiquent la présence de sites actifs spécifiques de nucléation dans les fibrilles du collagène. Neuman et Neuman (1958) ont avancé une hypothèse suivant laquelle le collagène de la dentine joue le rôle d'agent de nucléation entraînant l'apparition d'une phase cristalline. Ces observations expérimentales témoignent de l'existence d'une relation étroite entre les cristaux formés et des groupements fonctionnels des fibrilles.

Bien que le collagène joue incontestablement un rôle important dans le processus de biominéralisation, il semblerait que du point de vue biologique, sa présence dans la matrice extracellulaire est nécessaire mais pas suffisante, et que d'autres composés spécifiques faisant partie des constituants de la MEC sont impliqués. Pautard (1966) a constaté que le collagène peut parfois être absent et que des protéines non-collagéniques peuvent jouer, comme le collagène, un rôle direct dans la minéralisation. Parmi ces protéines non-collagéniques, on trouve les phosphoprotéines (osteopontines, sialoprotéines et glycoprotéines), le Gla-protéine (osteocalcine), l'ostéonectine et les protéoglycanes (Boskey, 1989). Ces protéines, classées comme inhibiteurs de croissance cristalline ou comme agents de nucléation, semblent réguler le processus de minéralisation des os et dents (Boskey, 1998). Les mécanismes d'inhibition et/ou d'initiation de la croissance sont complexes et encore incompris pour certaines molécules.

L'ostéopontine, les sialoprotéines, et les glycoprotéines sont trois phosphoprotéines qui ont été localisées au front de la minéralisation des tissus calcifiés (os et dents) (Reynolds et al., 1982; Glimcher, 1989). Ces protéines polyanioniques se caractérisent par une grande densité de charges négatives, due essentiellement aux groupements sulfates, carboxyles, et phosphates. Cela leur confère une grande propension à se lier au calcium et une affinité élevée pour les fibrilles de collagène (Eanes, 1992). Plusieurs études ont mis l'accent sur le rôle multiple de ces

macromolécules dans la biominéralisation. Ainsi, elles ont été identifiées comme agents assurant la liaison par complexation entre les protéines de la MEC, modulateurs de la fonction des ostéoclastes, nucléateurs du dépôt minéral d'hydroxyapatite, et inhibiteurs de la formation et la croissance des cristaux d'apatites (Glimcher, 1989; Boskey, 1992). D'autres études réalisées *in vitro* ont suggéré que l'action multiple des phosphoprotéines est fortement conditionnée par leur concentration dans le milieu extracellulaire (Boskey et al., 1993). En effet, elles facilitent la nucléation des cristaux phosphocalciques à de faibles concentrations ou lorsqu'elles s'adsorbent à la surface des fibrilles du collagène, et inhibent la biominéralisation à de fortes concentrations (Linde et al., 1989; Boskey et al., 1990). Des observations similaires ont été rapportées lors de l'étude menée *in vitro* sur l'effet de l'albumine sur la croissance cristalline du phosphate octocalcique triclinique (Combes et Rey, 2002).

L'action inhibitrice des phosphoprotéines, en particulier les ostéopontines, a été attribuée aux phénomènes d'adsorption intervenant à l'interface protéines-minéral et impliquant les groupements phosphate; cela se traduit par un blocage des sites spécifiques responsables du processus de croissance cristalline (Termine et al., 1981; Aoba et Moreno., 1985).

Contrairement aux phosphoprotéines, l'ostéocalcine et l'ostéonectine n'ont pas été observées dans les régions où la formation des premiers cristaux s'amorce, mais sont plutôt localisées durant les derniers stades de minéralisation de la MEC. De ce fait, elles sont impliquées dans la régulation et le contrôle de la taille des cristaux néoformés et la vitesse de croissance cristalline (Roach, 1994).

L'ostéocalcine (OC) ou GLA-protéine osseuse est la protéine non collagénique la plus abondante de l'os. Les groupements carboxyles sont responsables de la grande affinité de ces macromolécules pour les sites calcium à la surface des cristaux phosphocalciques de l'os (Flade et al., 2001). Hauschka et al. (1989) suggèrent une adsorption préférentielle de l'ostéocalcine sur le plan (001) de l'hydroxyapatite ; ceci a été expliqué par la grande similarité entre les distances interatomiques des ions calcium dans le plan de croissance de l'hydroxyapatite (5,45 Å) et la distance qui sépare les groupements carboxyliques (5,4 Å) (Flade et al., 2001). Toutefois, une question se pose quant au rôle de l'adsorption préférentielle: est ce que ce phénomène peut-il expliquer l'effet de ces macromolécules comme agent de nucléation et/ou inhibiteur de la croissance cristalline des biominéraux ?

Des études menées sur les phénomènes de dissolution-reprécipitation des phosphates de calcium dans des conditions biomimétiques ont montré que l'activité de l'ostéocalcine se distingue suivant la concentration examinée (Hunter et al., 1996a; Gelinsky et al., 2004). Ainsi, à de faibles concentrations (<100µg/ml) l'OC montre un

effet inhibiteur, tandis qu'ils observent un effet inverse à de fortes concentrations ($>100\mu\text{g/ml}$).

Les effets des protéines matricielles sur la minéralisation ne sont pas clairement élucidés et semblent dépendre du système étudié, de leur conformation, de leur concentration ainsi que de la présence ou non d'autres molécules avec lesquelles elles peuvent interagir (Cuisinier, 1996; Boskey, 1996a; Hunter, 1996b). Devant l'incohérence apparente de certains résultats expérimentaux, des auteurs ont suggéré que la stabilisation et l'orientation de la croissance des amas de phosphate de calcium ne dépendraient que des contraintes spatiales imposées par les protéines matricielles et non pas d'interactions spécifiques avec le cristal (Cuisinier, 1996).

I-1-4-3- Précurseur de la biominéralisation

Il est important de souligner que les études chimiques sur les apatites synthétiques ont révélé que leur formation est souvent précédée par l'apparition très transitoire d'autres phosphates de calcium. Cependant, l'existence de tels précurseurs au cours de la biominéralisation du tissu osseux n'a pas pu être montrée avec certitude. Les méthodes d'analyse imposent une technique de préparation des échantillons qui peut modifier le phosphate de calcium. Le mauvais état de cristallisation de la phase minérale, la petite taille de ses cristaux, et enfin la présence de la matrice organique sont autant de facteurs limitant pour les informations obtenues par les techniques physico-chimiques d'investigations.

Si la détermination de la nature du premier minéral formé dans les milieux physiologiques pose encore de nombreux problèmes techniques, de nombreux travaux ont émis l'hypothèse de différents précurseurs potentiels. Le phosphate de calcium amorphe (ACP) a été proposé comme phase initiale (Betts et Posner., 1974). Il a été également suggéré que la première phase solide formée pourrait être de la brushite (phosphate dicalcique dihydraté ou DCPD) ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), dans des conditions de sursaturation et de bas pH (Roufosse et al., 1984). Cette brushite pourrait être un précurseur de l'apatite et/ou servir de germe pour une croissance apatitique en surface du cristal de brushite. Le phosphate octocalcique (OCP) pourrait être un autre précurseur, capable de se transformer en apatite dans des conditions physiologiques de pH et de sursaturation (Brown et al., 1988).

Bien que l'OCP, la DCPD et l'ACP soient proposés comme précurseurs du minéral de l'os, leur mise en évidence par DRX et d'autres méthodes d'analyses reste encore controversée. La plupart des résultats, signalant la présence de ces phases aux tous premiers stades de la minéralisation de l'os, n'ont pu être confirmées.

Des études plus précises, utilisant la diffraction des rayons X et les fonctions de distributions radiales, ont invalidé la théorie de précurseurs amorphe (ACP) précédant la formation du minéral osseux (Blumenthal et al., 1981; Grynepas et al., 1984).

Ces auteurs ont montré que le minéral osseux même au premier jour de sa formation (os embryonnaire) est essentiellement formé d'une phase apatitique mal cristallisée.

Par ailleurs, dans une étude menée par micro spectrométrie Raman de l'os crânien intra-membranaire Crane et al. (2006), semblent identifier des phases transitoires distinctes qui précèdent la formation d'apatites mal cristallisées de l'os, tel le phosphate octocalcique triclinique (OCP) et/ou le phosphate de calcium amorphe (ACP). Ces observations ont suscitées des critiques différentes dans la littérature. En effet, il a été établi que les premières phases mal cristallisées de l'os contiennent un grand nombre d'ions carbonate labiles localisés dans des environnements non-apatitiques (Grynepas et Omelon, 2007; Rey et al., 2009). Or aucune structure octocalcique ou autres phases cristallines non-apatitiques contenant des ions carbonate n'a été identifiée (Lyengar et Tandon, 1999). Cela rend incompatible les conclusions déduites par le groupe de Crane. De plus, aucune phase autre que l'apatite ne peut rendre compte des différents types d'environnements non-apatitiques mis en évidence dans le minéral osseux.

L'étude microscopique (Crane et al., 2006) a uniquement focalisé sur l'ion phosphate pour identifier les dites phases transitoires. En dépit des analogies qui existent entre les bandes infrarouges des groupements phosphates dans les apatites mal cristallisées et l'OCP triclinique, on peut facilement déceler la présence de cette phase (OCP) grâce à la bande spécifique aux ions phosphate qui apparaît vers 915cm^{-1} . Cette bande n'a jamais été détectée dans des échantillons de l'os (Eichert et al., 2004). Cela rend incompatible l'identification de cette phase minérale comme précurseur du minéral osseux.

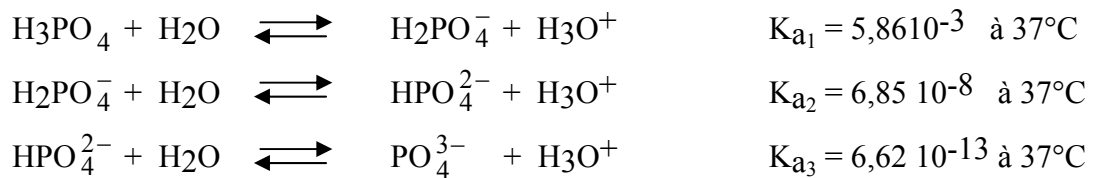
I-2- Phosphates de calcium synthétiques

I-2-1- Généralités

Les phosphates de calcium jouent un rôle important dans divers domaines. Dans l'industrie, ces minerais sont la source principale des engrais phosphatés et servent à préparer l'acide phosphorique et différents dérivés phosphatés (Amjad, 1997). De plus, leurs propriétés électroniques sont largement mises à profit dans la conception des lampes fluorescentes (Budin et al., 1979) et des matériaux pour Laser (Wright et al, 2009). Ils sont également utilisés en chromatographie pour la séparation et la purification des molécules organiques (Gorbunoff, 1994; Shibusawa et al., 1994).

Outre leur importance industrielle, les phosphates de calcium apatitiques ont connu un grand essor dans le domaine des biomatériaux. En effet, grâce à leur composition chimique proche de la phase minérale des tissus osseux, leurs propriétés de biocompatibilité et de bioactivité les rendent utilisables sous diverses formes : substituts osseux, système de libération de principes actifs, céramiques et ciments etc...(LeGeros, 1991; Aoki, 1994; Ginebra et al., 2006; Tadier, 2009).

Les sels de calcium de l'acide orthophosphorique (H_3PO_4) constituent une grande famille de composés solides: les orthophosphates de calcium. Ces composés dérivent en général de la neutralisation de la première acidité (sels monobasiques : MCPA et MCPM), de la deuxième acidité (sels dibasiques : DCPA et DCPD) et / ou de la troisième acidité de H_3PO_4 (sels tribasiques : OCP, PTCa). Les équations de réactions acido-basiques suivantes représentent les neutralisations successives des différentes acidités de l'acide orthophosphorique.



Les propriétés de dissolution de ces phosphates de calcium dépendent de leurs caractéristiques physico-chimiques, en particulier le rapport molaire Ca/P, la structure cristallographique et la surface spécifique (Hina, 1996). Ainsi, en fonction du rapport molaire Ca/P qui varie de 1,33 à 1,67, nous pouvons définir plusieurs familles d'orthophosphates de calcium répertoriées dans le tableau I-3.

Parmi ces phosphates de calcium, notre choix a porté sur trois types d'apatites connues par leurs applications dans le domaine des biomatériaux :

Hydroxyapatite (HA);

Apatites nanocristallines carbonatées;

Phosphate octocalcique apatitique (OCPa) et phosphate octocalcique apatitique carbonatée (OCPa-c).

Tableau I-3: Orthophosphates de calcium et caractéristiques : rapport atomique (Ca/P) et solubilité.

Phosphate de Calcium	Nom abrégé	Formule Chimique	Ca/P	Solubilité (pK _s)*
Phosphate monocalcique				
anhydre	MCPA	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,50	
monohydraté	MPCM	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , H ₂ O	0,50	
Phosphate dicalcique				
anhydre (monétite)	DCPA	CaHPO ₄	1,00	6,04
dihydraté (brushite)	DCPD	CaHPO ₄ , 2H ₂ O	1,00	6,73
Phosphate octocalcique				
triclinique	OCP _t	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ , 5H ₂ O	1,33	98,6
apatitique	OCP _a	Ca ₈ (HPO ₄) _{2,5} (PO ₄) _{3,5} (OH) _{0,5}	1,33	
amorphe	OCP _{am}	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ , nH ₂ O	1,33	
Phosphate tricalcique				
α ou β	TCP _(α,β)	Ca ₃ (PO ₄) ₂		28,5- 29,6
apatitique	TCP _a	Ca ₉ (PO ₄) ₅ (HPO ₄)(OH)		
amorphe	ACP	Ca ₉ (PO ₄) ₆ , nH ₂ O		
Hydroxyapatite hosphocalcique*				
stoechiométrique	HA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	117,2
non-stoechiométrique	PCA	Ca _{10-x} ((PO ₄) _{6-x} (HPO ₄) _x)(OH) _{2-x}	1,33-1,67	

* Produit de solubilité (pK_s) à 37°C (Wang et Nancollas, 2008)

I-2-2- Hydroxyapatite

Une des formes les plus répandues du phosphate de calcium est l'hydroxyapatite (HA). De formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, elle appartient à une grande famille de composés isomorphes. L'hydroxyapatite phosphocalcique cristallise dans le système hexagonal (groupe spatial $P6_3/m$) avec les paramètres cristallographiques suivants (Elliott, 1994) :

$$\underline{a} = \underline{b} = 9,432 \text{ \AA} \text{ et } \underline{c} = 6,881 \text{ \AA} \quad ; \quad \alpha = \beta = 90^\circ \text{ et } \gamma = 120^\circ$$

La maille cristalline contient un motif $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Sa structure peut être décrite en considérant un empilement hexagonal de groupements PO_4^{3-} qui laisse apparaître deux types de tunnels parallèles à l'axe c (Figure I-5).

Les premiers types de tunnels sont centrés sur les axes ternaires de la structure et sont occupés par 4 ions Ca^{2+} (communément désignés par Ca-I). Leur diamètre est d'environ 2 Å. Ils apparaissent sur la projection de la structure par rapport au plan (010). Le second type de tunnel est centré sur les axes à symétrie hexagonale parallèles à l'axe c . Leur diamètre est compris entre 3 et 3,5 Å. Ils sont occupés par 2 ions OH^- (au centre) et par 6 ions Ca^{2+} (notés Ca-II). La projection de la structure sur le plan (001) met en évidence la symétrie hexagonale de ces tunnels.

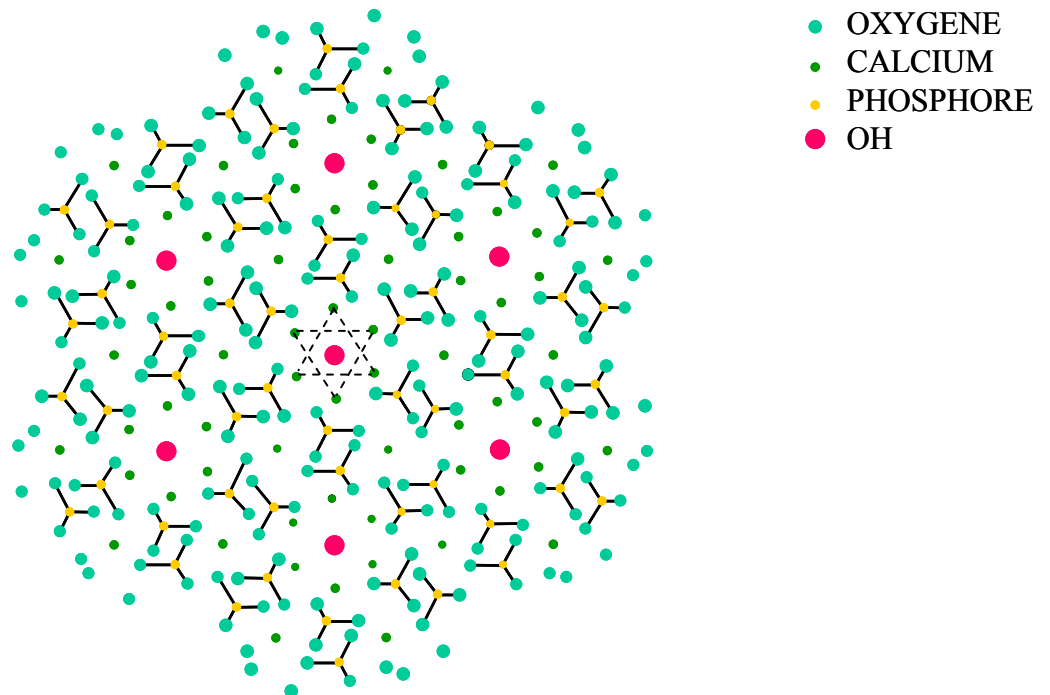


Figure I-5 : Projection de la structure de HA sur le plan de base (001).

Les tunnels revêtent une importance particulière dans le comportement physicochimique de l'apatite par leur aptitude à favoriser les échanges ioniques. En effet, les ions OH^- jouissent d'une grande mobilité et peuvent donc être facilement substitués soit par des ions monovalents (Cl^- ou F^-), soit par des ions bivalents (CO_3^{2-} , O^{2-} , S^{2-}) et/ou des lacunes (Elliot, 1994; Trombe, 1972). Des substitutions sont également possibles sur les sites Ca^{2+} (Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} ...) (Tomazic et al., 1991) ainsi que sur les sites PO_4^{3-} (CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} ...) (Bonel, 1972; Heughebaert, 1977). Afin de maintenir l'électroneutralité au sein de la maille, les échanges ioniques mettant en jeu des espèces de valences différentes entraînent la création de lacunes sur les sites Ca^{2+} et/ou sur les sites OH^- . Les sites PO_4^{3-} sont toujours saturés à 6 ions par maille quels que soient les écarts à la stoechiométrie engendrés par les multiples substitutions.

A l'échelle atomique, que ce soit par la création de lacunes et/ou pour des raisons d'encombrement stérique, les substitutions ioniques modifient les paramètres de maille de la structure. A plus grande échelle, les substitutions engendrent, de manière générale, une baisse de cristallinité, une diminution de la stabilité thermique ainsi qu'une augmentation de la solubilité (Merry, 2000). Le cas de la substitution des ions OH^- par les ions F^- (fluoroapatite) déroge cependant à cette règle. En effet, la substitution par le fluor tend à renforcer la structure du composé et à en réduire la solubilité, peut être en raison de l'existence de liaisons hydrogène entre les ions fluorures et les ions OH^- (LeGeros, 1991).

I-2-3- Apatites non stoechiométrique

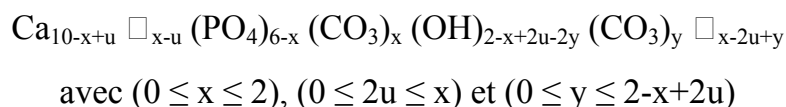
Comme cela a été rapporté précédemment, la phase inorganique des tissus osseux s'apparente à une apatite phosphocalcique non stoechiométrique (poly-substituée). Les ions de substitution sont de nature diverse et se répartissent sur chacun des trois sites qu'offre la structure apatitique. Leurs teneurs sont variables et dépendent du tissu considéré. Au côté des ions alcalins, alcalino-terreux et halogènes qui n'entrent dans la structure qu'en faibles proportions (teneur totale < 1,5 % en masse), les ions carbonate font état d'ions de substitution prépondérants. Leur teneur varie entre 3 % et 7 % suivant les tissus (Legros et al., 1986).

Les ions carbonate autorisent deux types de substitutions distinctes au sein de la structure apatitique communément désignés par A et B. Dans une substitution dite de type A, les ions carbonate trouvent place dans les sites OH^- ; la substitution de type B correspond à un remplacement partiel des ions phosphate par les ions carbonate (Bonel, 1972). Ce type de substitution des ions PO_4^{3-} et/ou des ions OH^- par les ions carbonate engendre des perturbations dans la structure apatitique qui conduisent à une augmentation de la solubilité du composé par rapport à celle de l'HA (LeGeros, 1991). De plus, la présence des ions carbonate dans le minéral apatitique intervient d'une

façon notable dans les processus biologiques tels le développement des caries dentaires, la résorption osseuse et les liaisons minéral-organique (Rey et al., 1989b).

La phase minérale des tissus osseux présente les deux types de substitutions (Elliott et al., 1985; Legros et al., 1986); elle s'assimile à une apatite carbonatée mixte de type AB. De plus, différentes études suggèrent que les carbonates substitués en site de type B sont majoritaires dans l'émail, l'os et la dentine (Barroug, 1982; Rey et al., 1991b). La proportion de carbonates de type A augmente cependant au cours du temps dans l'os (Kuhn et al., 2008).

Le nombre de sites A pouvant être carbonatés découle du nombre d'ions carbonate en site B. Cependant, hormis cette condition restrictive, il n'existe aucun lien entre la teneur en ions carbonate en site B et celle en site A (Vignoles, 1984; Elliott, 1994). Les apatites mixtes AB peuvent alors répondre à la formule suivante :



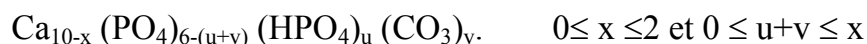
Selon le mode de synthèse choisi, il est possible d'obtenir des apatites carbonatées bien ou mal cristallisées. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux phosphates de calcium carbonatés mal cristallisés, nommés Apatites Nanocristallines Carbonatées (ANC), et ce vues les caractéristiques physico-chimiques particulières qu'ils présentent ainsi que leur grande similitude avec le minéral du tissu osseux (Hina, 1996; Cazalbou, 2000; Rey et al., 2007a).

I-2-3-1- Apatites Nanocristallines Carbonatées (ANC)

Ces composés, fraîchement préparés à température ambiante et à pH neutre, possèdent les caractéristiques des apatites biologiques au niveau de la microstructure (taille et morphologie des cristallites), de la surface spécifique, de la composition chimique ainsi qu'à la présence d'une couche hydratée à leur surface.

Une caractéristique majeure de ces matériaux est la présence dans cette couche d'environnements non apatitiques, qui n'existent pas dans les apatites bien cristallisées (Rey et al., 1996; Hina, 1996). Cette couche hydratée est riche en ions minéraux labiles et facilement échangeable, notamment les espèces carbonates et phosphates; elle évolue au cours du temps et est responsable de la grande réactivité de ces matériaux en termes d'échanges ioniques et capacité d'adsorption vis-à-vis de leur milieu biologique environnant (Ouzat et al., 1999; Cazalbou, 2000; Benaziz et al., 2002; Barroug et al., 2004 et 2008).

La formule chimique des précipités ANC peut être établie si on considère que la majorité des ions carbonate étaient substitués aux ions phosphate, qu'il n'existait pas de lacune dans les sites de ces ions et que les sites anioniques des tunnels étaient inoccupés. Ces apatites peuvent répondre à la formule chimique suivante:



Rappelons en effet, que les apatites comportant des lacunes dans les sites phosphates, n'ont jamais été décrites. Il semble que ces ions volumineux constituent le squelette du réseau qui ne peut exister avec des défauts importants sur ces sites. En ce qui concerne la localisation des ions carbonate, l'hypothèse est justifiée dans la mesure où la majorité de ces groupements se substituent aux ions phosphate (Vignoles et al., 1988). L'absence d'ions dans les tunnels n'est pas rigoureusement exacte puisque des ions carbonate de type A sont souvent identifiés par FTIR (Rey et al., 2007b; Eichert et al., 2008). Par ailleurs les bandes OH ne sont pas formellement identifiées et leur concentration est très faible comme dans le minéral osseux (Legros, 1984, Rey et al., 1995b).

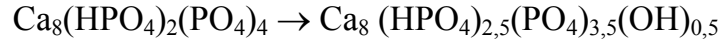
L'établissement des formules chimiques de ce type de composés ayant une très grande surface spécifique est toutefois critiquable dans la mesure où une grande partie des ions se trouvent à proximité de la surface minérale probablement très perturbée. Bien que ces formules chimiques autorisent une comparaison aisée des différentes apatites nanocristallines au cours de leur maturation, nous éviterons dans ce travail ce type de présentation qui ne rend pas en compte de l'hétérogénéité des échantillons.

I-2-3-2-Phosphate Octocalcique Apatitique (OCPa)

Le phosphate octocalcique apatitique (OCPa) est le composé apatitique le plus riche en lacunes cationiques (Ca/P = 1,33). Il diffère des apatites nanocristallines citées précédemment par son mode de préparation. En effet, les apatites ANC sont formées aisément dans un milieu aqueux par précipitation rapide à température ambiante et à pH neutre, tandis que les phosphates octocalciques de structure apatitique sont obtenus par séchage à l'étuve à 80°C du gel d'OCP amorphe. Ce dernier a été précipité en milieu eau-éthanol à pH basique et 37°C (Zahidi, 1984).

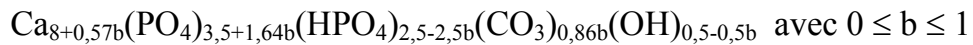
L'introduction de l'éthanol dans le milieu réactionnel exerce une influence sur la constante diélectrique du milieu et par conséquent sur les propriétés acido-basiques de l'acide phosphorique. Ainsi, le pK_a de la troisième acidité de H_3PO_4 dans un mélange eau-éthanol est très élevé par rapport à sa valeur dans l'eau. Ceci a pour effet la réduction de la force du couple acidobasique $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$. Il en résulte qu'à pH donné, où existent préférentiellement les deux formes conjuguées; le rapport $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ est beaucoup plus élevé dans le mélange eau-éthanol que dans l'eau.

On favorise ainsi la formation de phosphates plus riches en HPO_4^{2-} et de rapport Ca/P faibles (OCP_{am}). Au cours du séchage, l' OCP_{am} cristallise et subit l'hydrolyse partielle d'un demi groupement PO_4^{2-} (Zahidi, 1984). La réaction se produisant lors du séchage est la suivante (Lebugle et al., 1986):



I-2-3-3- Phosphate Octocalcique Apatitique Carbonaté (OCPa-c)

Ces matériaux sont obtenus dans les mêmes conditions expérimentales que l'OCPa (milieu eau-ethanol à 37°C). L'introduction des ions carbonate dans les solutions de synthèse donne lieu, après séchage des gels obtenus à 80°C, à des phosphates octocalciques apatitiques carbonatés similaires au minéral osseux (Dabbarh et al., 2000). L'état de cristallisation de ces composés se dégrade au fur et à mesure que le taux des carbonates augmente. Il a été montré par ailleurs, que les ions carbonate se fixent essentiellement en site B et beaucoup plus faiblement en site A (Bennani et al., 1993). La formule générale s'exprime de la façon suivante:



Ces apatites déficientes et de composition chimique plus proche de celle des tissus calcifiés, ont une aptitude remarquable à la compaction et ont été proposées en tant que support de médicaments implantables à libération retardée (Lebugle et al., 2002).

II- OSTÉOPOROSE ET BISPHOSPHONATES

II-1- Ostéoporose

II-1-1- Définition

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'ostéoporose est une maladie caractérisée par une densité minérale faible et une détérioration de la microarchitecture de l'os, conduisant à une fragilité osseuse accrue et à une augmentation secondaire du risque de fracture (Figure I-6). A l'échelle biologique, cette affection du squelette est induite par un déséquilibre cellulaire dans le remodelage osseux suite à un surcroît d'activité des ostéoclastes par rapport aux ostéoblastes (Fleisch, 1998).

Le risque d'apparition du déficit osseux est plus important avec la disparition des hormones sexuelles, en particulier chez la femme lors de la ménopause. En effet, à ce moment là, la production d'œstrogènes diminue substantiellement parce que les ovaires, qui produisent la quasi-totalité de ces hormones, cessent de fonctionner. Une femme peut perdre de 2 à 5 % de sa densité osseuse tous les 5 ou 10 ans suivant sa ménopause. Cela explique que l'ostéoporose frappe une femme sur 4 et seulement un homme sur 8 après 50 ans. D'autres éléments comme les carences alimentaires en calcium et en vitamine D, la sédentarité et l'absence d'exercice physique sont également des facteurs de risques de fragilisation osseuse (Breuil et Euller-Ziegler, 2004).



Figure I-6: Vue microscopique d'un os sain (à gauche) et d'un os ostéoporotique (à droite).

II-1-2- Traitements médicamenteux

Le traitement de l'ostéoporose (préventif ou curatif) a longtemps été dominé par le traitement hormonal substitutif (THS). Ce traitement a constitué pendant près de 50 ans la thérapeutique la plus largement utilisée dans tous les pays pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose. Cette situation a été remise en cause car l'absence de protection cardio-vasculaire et une augmentation légère du risque de cancer du sein notée dans les populations étudiées n'apparaissaient plus compatibles avec l'utilisation prolongée d'un traitement hormonal (Fournier et al., 2003).

Si l'usage du THS est nettement remis en question du fait d'un rapport bénéfice/risque globalement défavorable à long terme (Azoulay, 2004), les bisphosphonates (BPs) demeurent une alternative thérapeutique efficace dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose (Fleisch, 2003; Russell et al., 2008). En effet, ils constituent une référence dans le traitement de diverses affections du tissu osseux, notamment celles impliquant des désordres du remodelage (Russell et Rogers, 1999).

II-2- Bisphosphonates

II-2-1- Historique

Les bisphosphonates ont été connus des chimistes au milieu du 19^{ème} siècle (Fleisch, 1998). Le premier bisphosphonate qui fut synthétisé « étidronate » a été utilisé pour traiter la myosite ossifiante (ossification de la musculature) (Basset et al., 1969). Les médicaments à base de bisphosphonates ont été mis au point au cours des trois dernières décennies pour le traitement de diverses pathologies liées à l'os, dents et métabolisme du calcium.

Les bisphosphonates ont également été utilisés comme inhibiteur de corrosion, et comme agent complexant dans l'industrie textile, engrais et les industries pétrolières (Browning et Fogler, 1996). Leur capacité à inhiber la précipitation du carbonate de calcium, à l'instar des polyphosphates, a été mise à profit dans la prévention de l'entartrage (Blomen, 1995)

La connaissance des caractéristiques biologiques de bisphosphonates remonte à une trentaine d'années. Les résultats des premières investigations ont été publiés par Fleisch et al. (1968). Ces auteurs ont trouvé que le plasma et l'urine contenaient des composés qui inhibent la précipitation de phosphate de calcium. Il s'agit du pyrophosphate inorganique, un composé qui n'a pas été décrit précédemment dans la littérature scientifique. Le pyrophosphate a ensuite montré *in vitro* sa capacité à empêcher la formation et la dissolution des cristaux de phosphate de calcium. *In vivo*, le pyrophosphate joue un rôle physiologique comme agent inhibiteur de la

calcification des tissus osseux et régulateur de la biominéralisation (Russell et Rogers, 1999).

Cependant, l'hydrolyse rapide des pyrophosphates a limité considérablement leur application dans le domaine médical. Toutefois, ces composés ont pu être utilisés dans la scintigraphie et contre les calculs dentaires (Guy et al., 1988). Cela a conduit les chercheurs à développer des analogues structuraux aux pyrophosphates possédant des activités physico-chimiques similaires mais résistant à l'hydrolyse enzymatique et donc non dégradés métaboliquement. Les bisphosphonates remplissent ces conditions.

II-2-2- Propriétés structurales

Le remplacement d'un atome d'oxygène de la molécule de pyrophosphate (P–O–P) par un atome de carbone (P–C–P) permet d'obtenir un groupe de molécules qui résistent à la pyrophosphatase (enzyme qui catalyse l'hydrolyse des pyrophosphates) tout en conservant les propriétés physicochimiques du pyrophosphate (Figure I-7-A). Il s'agit donc d'analogues stables du pyrophosphate qui sont résistants à l'hydrolyse. La liaison d'un atome de carbone à deux groupements phosphonate a donné à ces composés leur nom de bisphosphonates (BPs). La structure P-C-P autorise un grand nombre de variations possibles, en changeant les deux chaînes latérales (R_1 , R_2) sur l'atome de carbone. C'est ainsi que l'on distingue deux catégories majeurs de bisphosphonates (Figure I-7-B): les non-amino bisphosphonates (non N-BPs) ou composés dits de première génération et les amino-bisphosphonates (N-BPs). Ces derniers possèdent une fonction amine sur l'une des chaînes latérales ; la fonction amine peut être présente dans ces dérivés sous forme d'un groupe aminoalkyle (dérivé de seconde génération) ou sous forme d'un hétérocycle avec un ou plusieurs atomes d'azotes (dérivé de troisième génération).

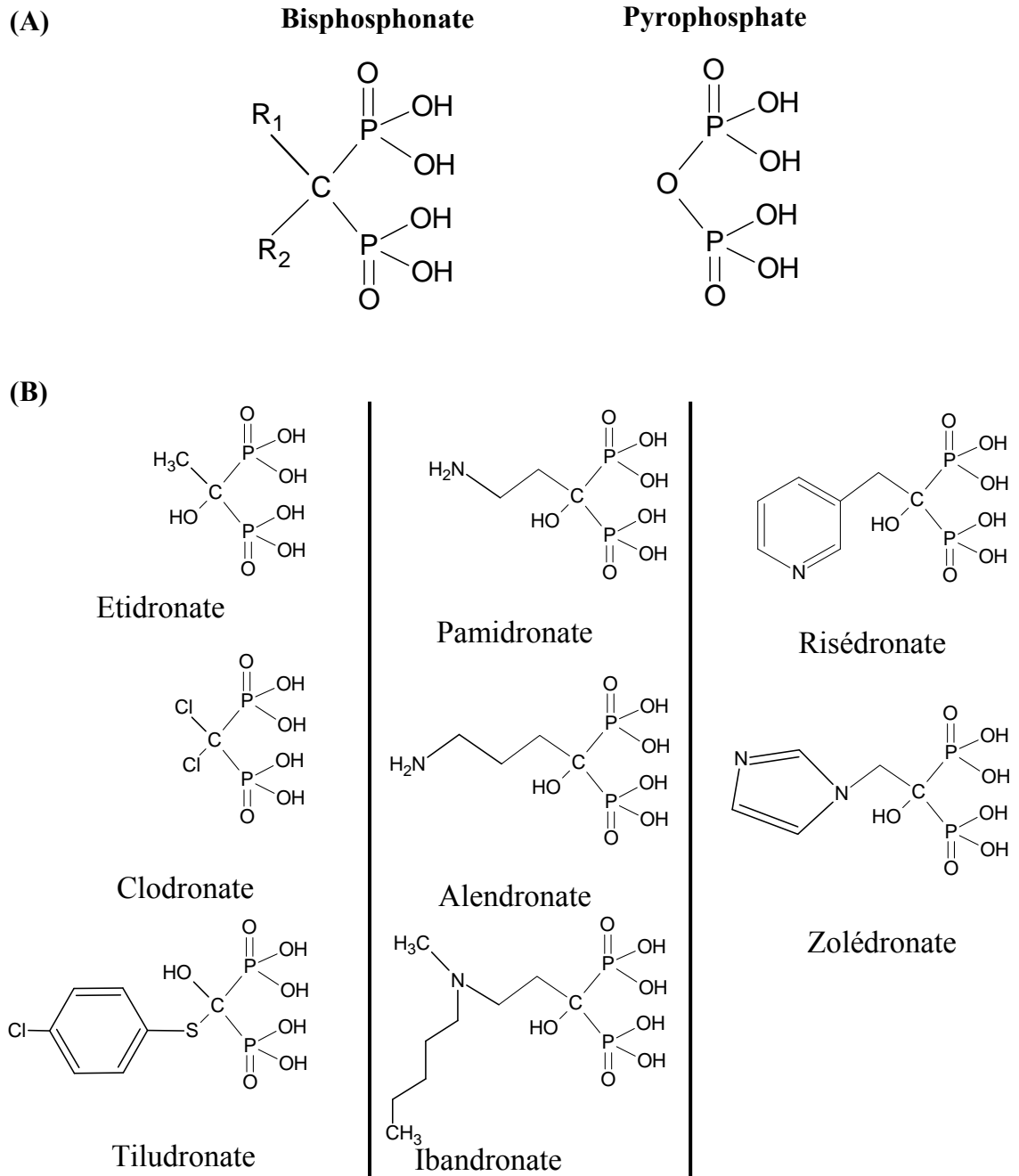


Figure I-7 : (A) Analogie structurale entre bisphosphonate et pyrophosphate;
 (B) Classification des bisphosphonates basée sur leurs mécanismes d'action biologique (Russell et al., 2007a).

II-2-3- Mécanismes d'action

L'inhibition de minéralisation normale ou ectopique ainsi que la diminution de la résorption osseuse sont les principaux effets des bisphosphonates. La compréhension du mode d'action des bisphosphonates a fait de grand progrès, mais la nature exacte de ces mécanismes n'est pas encore entièrement démêlée. Il se pourrait bien que plusieurs mécanismes opèrent simultanément.

II-2-3-1- Inhibition des minéralisations (Calcification)

Comme le pyrophosphate, les bisphosphonates inhibent *in vitro* la formation, l'agrégation et ralentissent aussi la dissolution des cristaux de phosphate de calcium (Fleisch, 2003). Tous ces effets sont à mettre en relation avec l'affinité marquée de ces composés pour le phosphate de calcium en phase solide, à la surface duquel ils s'adsorbent fortement. Cette propriété est de grande importance parce que c'est la base de l'utilisation de ces composés en tant que marqueurs du squelette en médecine nucléaire et la base de leur localisation sélective dans l'os quand ils sont utilisés comme drogues (Fleisch, 2003).

De façon similaire, les bisphosphonates inhibent efficacement la calcification normale ou ectopique *in vivo* (Fleisch et al., 1970). La dose nécessaire pour induire ces effets est relativement importante et varie selon les sujets étudiés et la durée du traitement. Par ailleurs, il existe une forte relation entre l'habileté des BPs à inhiber la formation des phosphates de calcium *in vitro* et leur efficacité sur les calcifications ectopiques *in vivo*. Cette relation suggère que l'effet inhibiteur *in vivo* peut être expliqué par des mécanismes physico-chimiques (Fleisch, 1993).

II-2-3- 2-Résorption osseuse

A l'origine, par analogie avec leurs propriétés rencontrées *in vitro*, on pensait que les bisphosphonates agissaient sur la résorption osseuse selon un effet inhibiteur de la dissolution du cristal. Avec l'arrivée de nouveaux composés, il est devenu clair que le pouvoir antirésorbant *in vivo* et *in vitro* de ces composés n'est pas seulement lié à leur aptitude à inhiber la croissance et la dissolution du cristal *in vitro* (Shinoda et al., 1983). Ceci est notamment illustré avec le cas du clodronate, qui en dépit d'une moindre affinité pour l'os que l'etidronate, possède un pouvoir antirésorbant supérieur (Russel et al., 1970). Ceci suggère donc que l'action antirésorbante des bisphosphonates n'est pas uniquement due à des effets physico-chimiques et toutes les données actuelles sont en faveur d'un mécanisme d'action cellulaire.

Le mécanisme d'action des bisphosphonates sur la résorption osseuse peut être considéré (Fleisch, 2003) à quatre niveaux liés les uns aux autres : (i) inhibition du recrutement des ostéoclastes, (ii) inhibition de l'adhésion des ostéoclastes à la matrice

minéralisée, (iii) raccourcissement de la durée de vie des ostéoclastes à cause d'une apoptose précoce et (iiii) inhibition de l'activité des ostéoclastes. Il est possible que les bisphosphonates agissent aussi, au moins en partie, via d'autres cellules telles les ostéoblastes. Il est admis que ces cellules ostéoblastiques contrôlent le recrutement et l'activité des ostéoclastes. Cela rend très probable que les BPs induisent les ostéoblastes à synthétiser un ou des inhibiteur(s) du recrutement des ostéoclastes et donc de la résorption osseuse.

Etant donné l'étendue de leurs effets sur les cellules, les mécanismes d'action cellulaire des BPs sur la résorption osseuse sont étroitement liés à leurs propriétés structurales. Ainsi, les non-amino-bisphosphonates (tiludronate, étidronate, clodronate...) s'incorporent dans l'ostéoclaste et aboutissent à la formation de métabolites toxiques de l'adénosine triphosphate (ATP) (Van Beek et al., 2003); ces espèces non hydrolysables, s'accumulent dans la cellule, l'inhibent puis la tuent (Russell, 2007b). Cependant, les amino-bisphosphonates (pamidronate, alendronate, ibandronate, risédronate, zolédronate...) ne sont pas métabolisés (incorporés) dans l'ostéoclaste mais agissent principalement en inhibant une enzyme de la biosynthèse du mévalonate, la farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) (Van Beek et al., 2003). Cette inhibition enzymatique empêche la prénylation et inhibe la fonction de petites protéines régulatrices responsables de l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP) (GTPases Ras, Rab, Rho et Rac), indispensable au processus de signalisation intracellulaire. Ceci perturbe la fonction cellulaire, et désorganise notamment le cytosquelette, fait disparaître la bordure en brosse, et aboutit à l'inactivation puis à l'apoptose de l'ostéoclaste (Russell, 2007c).

III- ADSORPTION AUX INTERFACES : CAS DE L'INTERFACE SOLIDE-LIQUIDE

III-1- Enjeu de l'étude des processus d'adsorption

Les processus d'adsorption aux interfaces solide-liquide interviennent directement dans différents domaines (biologie, géologie, minéralogie, procédés industriels,...). En chimie industrielle par exemple, les phénomènes d'adsorption jouent un rôle fondamental dans les procédés associés à l'utilisation de catalyseurs (Weiss et Rank, 2002). Les propriétés d'adsorption sont également à la base de procédés de séparation solide-liquide par flottation (Vanthuynne et Maes, 2002) et du développement des colonnes utilisées comme supports de séparation et purification des molécules organiques par chromatographie (Gorbunoff, 1984).

Dans le domaine biomédical, la connaissance des mécanismes d'adsorption contribue directement ou indirectement à mieux comprendre les processus de biominéralisation. Il est bien admis, sur la base des différentes études, que la régulation du processus de minéralisation des tissus (initiation de minéralisation et/ou croissance cristalline) est fortement contrôlée par des phénomènes d'adsorption impliquant les molécules organiques présentes dans les tissus calcifiés (Glimcher et Muir, 1984; Boskey, 1989b; Combes et Rey, 2002).

Au vu du contexte général de cette étude, il paraît évident que l'étude des processus d'adsorption aux interfaces entre biomatériaux apatitiques et molécules thérapeutiques ouvrirait la voie à de nouvelles stratégies de traitement local des maladies osseuses. Les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes mis en jeu dans l'interaction entre principes actifs et phosphate de calcium sont à la base de la conception de matériaux bio-inorganiques à fonctionnalités élargies permettant la libération contrôlée d'agents thérapeutiques et de facteurs de croissance.

Cette partie rappelle les principes généraux de l'adsorption et présente quelques études réalisées dans ce domaine. Nous nous intéresserons particulièrement aux travaux effectués sur l'interaction de molécules biologiques et à visées thérapeutiques avec des phosphates de calcium synthétiques.

III-2- Adsorption

L'adsorption est la rétention d'un composé à une interface liquide-gaz, liquide-liquide, solide-gaz ou liquide-solide. D'une manière générale, elle est définie comme une accumulation de molécules d'un gaz ou d'un soluté (adsorbat) qui se produit au contact d'une surface d'un adsorbant (Barroug, 1989).

On distingue principalement deux types d'adsorption qui diffèrent par les chaleurs de réaction mises en jeu:

- Adsorption physique (ou physisorption), où les molécules d'adsorbat sont liées à l'adsorbant par des forces de Van der Waals. La chaleur de réaction est faible (2 à 5 kcal/mol). La nature chimique des molécules physisorbées ne subit pas des modifications notables par rapport à celle à l'état gazeux ou à l'état liquide. En général, ce processus d'adsorption est rapide et réversible.

- Adsorption chimique (ou chimisorption), où une véritable réaction chimique a lieu entre l'adsorbant et l'adsorbat. Les chaleurs de réaction sont beaucoup plus importantes; elles peuvent atteindre plusieurs centaines de kilocalories. Dans ce cas, la structure moléculaire de l'adsorbat est fortement modifiée.

Notons que certains modes d'interaction adsorbant-adsorbat échappent à ces deux types d'adsorption. Elles correspondent à des énergies d'adsorption intermédiaires: c'est le cas par exemple des liaisons assurées par un transfert de charge entre les molécules adsorbées et la surface de l'adsorbant.

Ces différents types d'adsorption ne s'excluent pas mutuellement et on peut trouver plusieurs types de liaison pour un système adsorbant-adsorbat donné.

III-2-1- Lois d'adsorption

Plusieurs types d'isothermes d'adsorption (expressions mathématiques) ont été développés pour décrire les courbes expérimentales de la quantité en éléments adsorbés en fonction de la concentration en solution à l'équilibre. Nous nous proposons de décrire brièvement les isothermes les plus couramment rencontrées dans le cas de l'adsorption solide-solution (Barroug, 1989; Rill et al., 2009).

III-2-1-1- Isotherme de Gibbs

Selon Gibbs l'adsorption consiste en une modification de la tension interfaciale solide-liquide. La loi d'adsorption repose uniquement sur des considérations thermodynamiques: elle ne suppose pas la présence des centres d'adsorption à la surface du solide, ni des propriétés particulières du film adsorbé. La relation générale de l'isotherme d'adsorption de Gibbs est donnée par l'équation:

$$Q = -\frac{C}{RT} \cdot \frac{\partial \gamma}{\partial C}$$

Q désigne la quantité d'adsorbat adsorbée par unité de surface, **C** la concentration de l'adsorbat à l'équilibre et γ la tension interfaciale. **R** et **T** correspondent respectivement à la constante des gaz parfaits et la température.

III-2-1-2- Isotherme de Langmuir

Cette loi suppose que le phénomène d'adsorption peut être considéré comme une réaction équilibrée entre un centre actif de la surface de l'adsorbant et une molécule de l'adsorbat. Le modèle de Langmuir repose sur les hypothèses suivantes:

Tous les sites d'adsorption possèdent la même énergie.

Formation d'une monocouche à la surface.

Les interactions entre molécules adsorbées à la surface sont négligeables.

L'équation caractéristique de cette réaction d'équilibre ainsi obtenue s'écrit:

$$Q = \frac{KNC}{1 + KC}$$

Q: Quantité d'adsorbat fixée par unité de surface de l'adsorbant ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$).

C: Concentration de l'adsorbat à l'équilibre dans la solution ($\mu\text{mol}/\text{L}$).

N: Nombre maximum de sites d'adsorption par unité de surface ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$).

K: Constante d'affinité de l'adsorbat pour la surface de l'adsorbant ($\text{L}/\mu\text{mol}$).

Les paramètres caractéristiques d'adsorption, **K** et **N**, sont obtenus à partir de l'équation de Langmuir linéarisée sous l'une des formes suivantes:

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{KNC} + \frac{1}{N} \quad ; \quad \frac{C}{Q} = \frac{C}{N} + \frac{1}{KN} \quad ; \quad Q = N - \frac{Q}{KC}$$

III-2-1-3- Isotherme de Freundlich

La loi de Freundlich s'applique le plus souvent lorsque la quantité adsorbée est très faible. L'équation caractéristique de cette loi s'écrit :

$$Q = aC^m$$

Où **Q** est la quantité de l'élément adsorbée à la surface de l'adsorbant et **C** la concentration de l'adsorbat dans la solution; **a** représente l'affinité de l'adsorbat pour la surface de l'adsorbant et **m** (<1) une constante. Les paramètres caractéristiques **a** et **m** sont généralement déterminés à partir de la forme logarithmique de l'équation:

$$\log Q = \log a + m \cdot \log C$$

III-2-1-4- Isothermes de Langmuir-Freundlich et Tòth

Ces modèles (Langmuir-Freundlich et Tòth) dérivent de celui de Langmuir et prennent en compte l'hétérogénéité de surface des sites d'adsorption. Les équations caractéristiques de ces lois considèrent une distribution gaussienne de l'énergie de surface et s'expriment par les formules suivantes:

$$\text{Langmuir-Freundlich} \quad Q = \frac{N (KC)^n}{1 + (KC)^n}$$

$$\text{Tòth} \quad Q = N \left[\frac{(KC)^n}{1 + (KC)^n} \right]^{1/n}$$

où n représente le paramètre de l'hétérogénéité de surface.

III-2-1-5- Isotherme BET

La théorie de Brunauer, Emmet et Teller (BET) est une extension de la loi de Langmuir (adsorption d'une monocouche); elle repose sur l'adsorption physique en multicouches. Cette loi peut être exprimée par l'équation suivante:

$$\frac{\frac{P}{P_0}}{V_{\text{ads}} \left(1 - \frac{P}{P_0}\right)} = \frac{1}{V_m C} + \left(\frac{C-1}{V_m C} \cdot \frac{P}{P_0}\right)$$

P : pression à l'équilibre;

P_0 : Pression de vapeur saturante de l'adsorbat à la température de l'expérience;

P/P_0 : Pressions relative;

V_{ads} : Volume adsorbé à l'équilibre sous la pression P ;

V_m : Volume d'adsorbant nécessaire à la formation d'une monocouche;

C : Constante liée aux caractéristiques thermodynamiques du système gaz-solide.

La relation de BET présente un intérêt pratique important car elle est utilisée pour déterminer les aires spécifiques externes des minéraux. En fait, l'équation de BET correspond à l'équation d'une droite de type $y = ax + b$:

$$b = \frac{1}{CV_m} \text{ l'ordonnée à l'origine et } a = \frac{(C-1)}{CV_m} \text{ la pente de la droite}$$

A partir de ces équations on peut déduire les valeurs des paramètres V_m et C :

$$V_m = \frac{1}{(a + b)} \quad \text{et} \quad C = \frac{1 + b}{a}$$

Connaissant $V_m(\text{cm}^3)$ on peut calculer la surface spécifique de l'échantillon:

$$S = \frac{1}{m} \cdot N \cdot a_s \cdot \frac{V_m}{V_M}$$

m : Masse de l'échantillon après séchage (g).

N : Constante d'Avogadro.

a_s : Aire effective occupée par une molécule de l'adsorbat m^2 .

V_M : Volume molaire de l'adsorbat cm^3 .

III-3- Eude expérimentale d'adsorption

III-3-1- Cinétique d'adsorption

L'étude cinétique du processus d'adsorption a fait l'objet de nombreux travaux. Généralement la durée de contact nécessaire pour atteindre l'équilibre pour les composés phosphocalciques est de quelques minutes à 2 heures. C'est le cas de l'interaction entre l'hydroxyapatite et divers adsorbats tels les acides aminés (Misra, 1997, Benaziz, 2002), l'ion acétate (Barroug et al., 1985), l'acide citrique (Misra, 1996), les citrates et phosphocitrates (Johnsson et al., 1991), les polyphosphonates (Rawls et al., 1982) et les protéines (Barroug, 1989; Shimabayashi et al., 1991; Suzuki et al., 1995; Ouizat, 2000). Ces cinétiques rapides ont aussi été notées lors de l'adsorption de bisphosphonates par des phosphates de calcium (Classens et Kolar, 1999. Roussière et al., 2005; Nancollas et al., 2006).

Des cinétiques relativement lentes (18 à 75 heures) ont par ailleurs été rapportées pour l'adsorption par des apatites phosphocalciques de la glycine (Barroug et al., 1985), la catalase (Barroug et al., 1998), l'acide polyacrylique (Misra, 1991a) et quelques protéines salivaires (Kambara et Norde, 1995).

Notons toutefois que, dans le cas des apatites, les cinétiques d'adsorption peuvent changer avec la composition et la nature du milieu (présence d'ions minéraux, pH...). En effet, la présence en solution d'ions calcium ou phosphate ralentit ou accélère le processus d'adsorption selon le pH et le caractère acido-basique de la molécule. Ainsi, les ions phosphate réduisent la vitesse d'adsorption de macromolécules acides, alors que les ions calcium ont un effet inverse (Barroug et al., 1998 et 2008). Par ailleurs, la variation du pH du milieu modifie la composition

chimique de surface de l'adsorbant et de l'adsorbat et donne lieu à des conditions dans lesquelles les partenaires peuvent être de même signe de charge (cinétique lente) ou de charge opposées (cinétique rapide).

III-3-2-Isothermes d'adsorption

Le processus d'adsorption de molécules d'intérêt biologique par les apatites phosphocalciques est généralement décrit par des isothermes de type Langmuir. C'est le cas des molécules présentant divers groupements fonctionnels actifs tels les acides aminés (Misra, 1997; Benaziz, 2002), des principes actifs (Misra, 1991b; Barroug et al., 2004; Vitha et al., 2008) et des protéines (Ouizat, 2000; Barroug et al., 1998). Le même type d'isotherme a aussi été noté pour la rétention de macromolécules par des supports de caractéristiques diverses (Norde et Haynes, 1995).

Dans le cas où l'adsorption est faible, les observations expérimentales suivent généralement la loi de Freundlich. C'est le cas de la fixation de la serine (Benaziz et al., 2001), d'ions acétate (Barroug, 1982) et du cisplatine (Barroug et Glimcher, 2002) par des apatites phosphocalciques.

Enfin, notons que dans certains cas, les isothermes d'adsorption présentent des formes relativement complexes et ne s'attachent pas à un type simple (Voegel et Frank, 1981; Misra, 1991b; Embery et al., 1998). Ces formes font souvent état de la multiplicité de mécanismes intervenant à la surface de l'adsorbant (adsorption en multicouches; précipitation de surface...) et dépendent fortement de la concentration en molécules d'adsorbat. C'est le cas par exemple des isothermes à paliers et sigmoïdal observé pour l'adsorption d'acides aminés, protéines, acides phosphoniques et antibiotiques par des supports apatitiques (Cho et al., 1984; Govers et al., 1994; D'Andrea et Fadeev, 2003). D'autres études menées sur l'adsorption par HA de la phosphoserine et du pamidronate ont observé, pour les grandes concentrations, une partie ascendante qui se manifeste après le palier de saturation (Misra, 1997; Schüessele, 2007). Dans ce cas les auteurs suggèrent la formation à la surface du minéral d'agrégats impliquant les ions minéraux du support (en particulier le calcium) et les molécules d'adsorbats.

III-3-3- Réversibilité du processus

Un processus d'adsorption est dit réversible si la déviation par rapport à l'équilibre initialement établi est tellement petite que les variables caractérisant l'état du système passent par les mêmes valeurs dans le sens inverse du processus (Norde et Haynes, 1995).

Le terme de "réversibilité" ne se réfère pas toujours au même phénomène et les résultats présentés dans la littérature paraissent parfois contradictoires. En effet la

procédure expérimentale peut être examinée de différentes manières : simple dilution de la teneur en adsorbant à l'équilibre, modification de la composition de la solution suite à l'ajout d'électrolytes actifs, variation du pH du milieu (Barroug, 1982). En outre, il est bien admis que le processus est fortement dépendant des caractéristiques physicochimiques du système adsorbant-adsorbant (Norde et al., 1986): nature de la surface de l'adsorbant, température, durée de contact, stabilité conformationnelle de l'adsorbant....

Le processus d'adsorption peut être selon les cas, totalement réversible, semi-réversible ou irréversible. Ainsi, l'adsorption du lysozyme par l'hydroxyapatite est totalement réversible vis-à-vis de la dilution (Barroug et al., 1989), alors que le processus devient semi réversible lorsque la protéine est chimiquement modifiée (Barroug et al., 1997). Cette différence a été attribuée par les auteurs aux types d'interactions mis en jeu lors de la rétention de la protéine; ces interactions sont purement électrostatiques dans le premier cas et hydrophobes dans le second. L'interaction de la catalase avec le support HA est totalement irréversible vis-à-vis de la dilution ou d'ajout d'ions phosphate dans le milieu (Barroug et al., 1998); le changement conformationnel de la protéine dans ce cas, suite à sa fixation (perte d'activité), maximise le contact et stabilise ainsi la protéine à la surface du solide.

L'adsorption de complexes de terbium de ligands possédant des groupements phosphonate (Tb-DOTP) par HA est semi réversible vis-à-vis de la dilution (Rill et al., 2009). L'irréversibilité de ces espèces est essentiellement due à la nature des interactions établies entre groupements phosphonate des molécules d'adsorbant et ions calcium de la surface de l'apatite.

L'étude de l'adsorption de molécules simples par des apatites phosphocalciques apatitiques a montré que le phénomène est réversible vis-à-vis de la dilution pour l'ion acétate, alors que la glycine se fixe de manière irréversible (Barroug et al., 1985). Des résultats similaires ont été rapportés pour le cisplatine (Barroug et Glimcher, 2002); cependant, une libération des molécules fixées a été observé après l'ajout des ions chlorure dans le milieu d'incubation. L'irréversibilité du processus d'adsorption pour les acides aminés tels la phosphoserine et la serine atteste de la forte interaction mise en jeu à la surface de l'apatite phosphocalcique (Benaziz, 2002).

La désorption dépend aussi du taux de recouvrement de la surface de l'adsorbant. Beissinger et Leonard (1981) ont rapporté que la désorption par dilution est plus importante lorsqu'on atteint le plateau d'adsorption qui indique la saturation de la surface du solide. Par ailleurs, l'adsorption de l'albumine de sérum humain par HA a été décrite comme irréversible vis-à-vis de la dilution et semi réversible vis-à-vis du pH (Hlady et Füredi-Milhofer, 1979).

III-3-4- Paramètres impliqués dans le processus d'adsorption

Les interactions mises en jeu à l'interface du système adsorbant-adsorbé sont étroitement liées à la fois à la nature du milieu d'incubation (pH, force ionique, température, concentration en ions actifs...) et aux propriétés physico-chimiques du solide (composition chimique, cristallinité, texture de surface,...).

III-3-4-1-Influence du pH

Ce paramètre semble très influent sur les mécanismes d'adsorption et plus particulièrement d'espèces ioniques. Il fixe, d'une part, le degré d'ionisation des groupements fonctionnels acide ou basique des adsorbés et contrôle par conséquent la spéciation en solution et modifie, d'autre part, la charge de surface du support tels les phosphates de calcium.

Il a été rapporté dans de nombreuses études (Barroug et al., 1989 et 1997; Lo'pez-Macipe et al., 1998) que selon la nature du système adsorbant-adsorbé et les conditions expérimentales adoptées, la variation du pH du milieu d'incubation favorise la rétention lorsque les partenaires sont de charges opposées (attraction électrostatiques) et montre un effet inverse lorsqu'ils sont de même signe de charge (répulsions électrostatiques).

La variation du pH du milieu d'incubation affecte également le caractère hydrophobe ou hydrophile de la surface de l'adsorbé (Sharpe et al., 1997). En effet, l'affinité et la quantité de protéines adsorbées (ribonucléase, lysozyme et α -lactalbumine) diminuent fortement avec l'augmentation du pH pour des adsorbants hydrophiles. Ces paramètres restent cependant inchangés pour des supports hydrophobes.

III-3-4-2-Influence de la force ionique

La force ionique peut intervenir dans le processus d'adsorption de différentes façons (Barroug, 1989):

- Elle exerce un effet écran sur la charge de surface du support et sur celle des molécules protéiques et affecte ainsi l'interaction entre adsorbant-adsorbé, d'une part, et entre molécules d'adsorbé, d'autre part.

- Elle peut affecter la stabilité conformationnelle de molécules protéiques;

- Elle peut aussi intervenir par l'adsorption simultanée de molécules d'adsorbé et d'ions électrolytes.

- Elle peut intervenir par la formation de paires d'ions qui diminuent la concentration en molécule libre du milieu.

Les résultats rapportés dans la littérature sur l'effet de la force ionique paraissent parfois contradictoires et dépendent des conditions expérimentales adoptées. Ainsi, l'augmentation de la teneur de chlorure de sodium dans le milieu d'adsorption conduit à une diminution de la quantité d'albumine de sérum bovin fixée à la surface de HA (Shimabayashi et al., 1991). Cependant, des études réalisées sur la même protéine ont montré que l'élévation de la force ionique par ajout de NaCl dans le milieu conduit à une légère augmentation des quantités adsorbées à la saturation, accompagnée d'une diminution de l'affinité (Wassell et al., 1995). Une tendance similaire a été également notée pour l'adsorption d'acides aminés par HA (Benaziz, 2002). Par ailleurs, la fixation de l'albumine de sérum humain par HA est indépendante de la force ionique (Aptel et al., 1988). Les mêmes observations ont été notées pour la rétention du lysozyme par HA, avec toutefois une diminution de la constante d'affinité (Barroug et al., 1989).

III-3-4-3- Influence de la teneur en ions minéraux

L'ajout d'ions minéraux constituant le réseau apatitique dans le milieu d'incubation modifie considérablement les propriétés de l'interface entre ces matériaux et leur environnement. Le rôle des ions phosphate et calcium est généralement décrit dans la littérature en termes d'ions déterminant du potentiel et l'adsorption est discutée en terme de phénomènes purement électrocinétiques (Mishra et al., 1980; Somasundaran et Wang, 1984; Amankonah et Somasundran, 1985). Cependant, cette approche ne peut expliquer la fixation d'espèces par des supports présentant le même signe de charge et ne prend pas en compte les interactions spécifiques impliquant la charge locale des sites d'adsorption ainsi que le degré d'ionisations des groupements fonctionnels des molécules d'adsorbats. Ainsi, la fixation de molécules anioniques telle la catalase à la surface de HA a lieu bien que les partenaires soient tous les deux négativement chargés et se traduit par une mise en solution d'ions phosphates (Barroug et al., 1998).

Il est bien admis que les ions phosphate présentent une grande affinité pour la surface du minéral apatitique et inhibent par conséquent la fixation de molécules anioniques, suite à leur compétition pour les sites actifs à la surface du minéral. Par ailleurs, les ions phosphate sont utilisés en chromatographie en phase liquide pour éluer les espèces anioniques.

Les observations expérimentales relatives à l'influence des ions phosphate dans l'adsorption et inversement, traduisent l'existence d'une réaction d'échange impliquant les molécules d'adsorbats de la solution et les ions phosphate de la surface du minéral apatitique (Barroug et al., 1998 et 2008).

Peu d'études ont reporté sur le rôle des ions calcium sur l'adsorption et leur phénomène reste mal élucidé. Pour des teneurs relativement importantes, ces ions peuvent donner lieu en présence d'adsorbats anioniques à des complexes solubles et/ou insolubles: c'est par exemple le cas de BSA (Shimabayashi et al., 1991), et de polyphosphonates (Rawls et al., 1982).

III-3-4-4- Influence de la température

La plupart des études d'adsorption par des supports phosphocalciques ont été effectuées à température ambiante (entre 20 et 25°C) ou à température physiologique; c'est notamment le cas de bisphosphonates (Vitha et al., 2008), de protéines (Barroug, 1989; Ouizat et al 1999), d'acides aminés (Moreno et al., 1984; Benaziz et al., 2001), et d'agents anticancéreux (Lebugle et al., 2002; Barroug et al., 2004). Cependant peu d'études ont été consacrées à l'effet de la température sur les phénomènes intervenant à l'interface entre adsorbant et adsorbat.

Rill et al. (2009) ont montré que la quantité de complexes de terbium de ligand phosphonique (Tb-BPPED) adsorbée à la saturation augmente d'environ 70 % lorsque la température passe de 20 à 37°C. Ceci a été attribué essentiellement à la déshydratation des molécules d'adsorbat ainsi qu'au déplacement des molécules d'eau de la surface de l'apatite ce qui favorise les interactions hydrophobes entre adsorbant et adsorbat. Le processus a été décrit comme étant endothermique. Le même effet a été noté pour l'interaction de supports phosphocalciques avec des complexes de lanthanide de bisphosphonates (Alves et al., 2003) et du cisplatine (Barroug et al., 2004). Cependant, l'adsorption du carboxyméthylcellulose par HA n'est pas affectée par la variation de la température de 0 à 55°C (Areas et Galembek, 1991).

L'élévation de la capacité de rétention avec la température a été attribuée à l'influence de ce paramètre sur la vitesse d'équilibre entre adsorbant et adsorbat ou sur l'équilibre lui-même (Jung et al., 1973). Dans le cas de protéines, la température semble induire en outre des changements structuraux ; ceci explique les valeurs positives des variations d'enthalpies ($\Delta H > 0$) notées pour l'adsorption de phosphoprotéines par HA (Moreno et al., 1982). Des observations similaires ont été rapportées pour la fixation de l'ADN (Chen et al., 2007) et du peroxydiphosphate (Shimabayashi et al., 1982) par la surface de HA.

III-3-4-5- Influence des propriétés physicochimiques du support

Les caractéristiques microstructurales des supports (cristallinité, morphologie, porosité, faciès cristallin, taille des cristallites et par conséquent la surface spécifique) sont aussi des paramètres à prendre en considération dans leur réactivité de surface. Ces propriétés microstructurales sont intimement liées aux conditions de synthèse de ces matériaux, à savoir : composition des solutions réactants, pH, température, durée de précipitation, maturation, conditions de synthèse...

La capacité de rétention d'albumine de sérum bovin (BSA) par des apatites de rapports atomiques (Ca/P) proches est plus importante lorsque les cristallites sont de grandes dimensions (Kandori et al., 1995a et 1995b): ainsi, la quantité fixée à la saturation par des cristaux de 84 nm de longueur (97mg/g) est environ le double que celle notée pour les cristallites de 37 nm (97mg/g). En fait, les cristallites de HA allongés selon l'axe c développent une proportion importante en faces (100), riche en sites calcium, favorable à la fixation de protéines acides. L'adsorption préférentielle sur les faces (100) a également été observée dans le cas de phosphoserine, proteoglycanes, ostonectine et Gla-protéines (Fujisawa et Kuboki, 1991). Cependant, les protéines basiques s'adsorbent sur les sites associés aux ions phosphate dans les faces (001) (Kawazaki et al., 1990; Kandori et al., 2002).

La composition chimique des apatites affecte considérablement les propriétés physico-chimiques de ces matériaux, et influe par conséquent sur leurs propriétés d'adsorption.

Les diverses substitutions qu'offre la structure apatitique influent considérablement sur la réactivité de ces matériaux. Ainsi, la substitution calcium-strontium dans le réseau cristallin de HA fait croître sa capacité de rétention des molécules de BSA (Kandori et al., 1995c). Le même effet a été noté pour l'adsorption du sulfure d'hydrogène par une HA dans laquelle le calcium a été substitué au nickel (Cherif, 1993). L'introduction d'ions hydrogénophosphate et magnésium dans le réseau apatitique favorise également l'adsorption de la BSA (Ouizat, 2000). Cependant, la présence des ions carbonate dans la structure des apatites défavorise l'adsorption de la BSA (Kandori, 1995b).

Dans le cas des ions fluorure, plusieurs controverses ont été rapportées dans la littérature quand à l'influence de ces ions sur les propriétés d'adsorption des apatites. L'adsorption de protéines de la dentine augmente avec le degré de fluoration de HA (Tanabe et al., 1988). De même, la capacité de rétention de la BSA est plus importante pour la fluoroapatite (FA), comparée au support de référence HA. Cependant, aucune variation significative de ces paramètres n'a été observée pour la même protéine suite à

la présence d'ions fluorure dans la structure de HA (Moreno et al., 1978) et pour les quantités de protéines salivaires retenues par HA et FA (Mandel et Concool, 1975).

Par ailleurs, Il a été noté que le taux fixé de phosphoserine et de serine est plus grand quand l'apatite est déficiente en calcium (Benaziz, 2002). Des observations similaires ont été notées pour l'adsorption du lysozyme par des apatites présentant différents degrés de déficience en calcium (Barroug, 1989).

L'indice de cristallinité est également important dans la réactivité des phosphates de calcium. Ainsi la fixation d'alendronate (Palazzo et al., 2007), de cisplatine (Barroug et al., 2004), de BSA (Ouizat et al., 1999), de phosphoserine et serine (Benaziz, 2002) se fait en quantité relativement importante pour les supports de basse cristallinité, comparés aux supports mieux cristallisés. La grande réactivité dans le premier cas a été attribuée à l'existence d'environnements labiles et facilement échangeables à la surface des cristaux qui les constituent.

L'évolution en solution des apatites nanocristallines modifie les propriétés microstructurales (cristallinité, dimensions des cristallites, surface spécifique) de ces matériaux et par conséquent leurs propriétés d'adsorption (Hina, 1996). En effet, les apatites présentant le plus faible temps de maturation présentent une capacité de rétention de la BSA supérieure (Ouizat et al., 1999; Benaziz, 2002). Cet effet a été relié à la présence d'une couche hydratée instable et riche en ions labiles, donnant aux nanoapatites leur forte réactivité de surface. Il a été montré également que l'adsorption de protéines tels le VEGF et le FGF est largement accrue pour des apatites possédant à leur surface une grande quantité d'ions labiles comparée aux poudres d'HA bien cristallisé (Midy et al., 1998 et 2001).

III-3-5- Mécanismes d'adsorption

L'adsorption de biomolécules par les surfaces apatitiques est le résultat de différents types d'interactions dans lesquelles plusieurs paramètres expérimentaux doivent être pris en considération. Les caractéristiques du support (texture, microstructure, densité de charge, hydrophobicité, composition chimique,...), de la solution (pH, température, composition chimique), ainsi que les propriétés intrinsèques de l'adsorbat (pie, conformation, hydrophobicité, dimension, stabilité,...) sont des facteurs largement discutées pour élucider les mécanismes d'adsorption (Barroug, 1989; Barroug et al., 1997; Misra, 1997; Barroug et al., 1998; Ouizat et al., 1999; Benaziz, 2002; Barroug et al., 2008; Al-Kattan et al., 2010).

Les mécanismes qui gouvernent les phénomènes à l'interface apatite-biomolécule restent mal élucidés et divers modes d'adsorption ont été proposés (Norde et Haynes, 1995; Josse, 2003; Chen et al., 2007, Jouillard et al., 2010).

- Interactions coulombiennes adsorbant-adsorbat ;
- Déshydratation de la partie hydrophobe de la surface du support et/ou des molécules d'adsorbat (interactions hydrophobes) ;
- Réaction d'échange ionique entre ions minéraux de la surface et groupements fonctionnels de l'adsorbat;
- Dissolution du minéral;
- Réaction de complexation et/ou précipitation.

Chapitre II

SYNTHESE ET CARACTERISATION DE PHOSPHATES DE CALCIUM & DE SELS DE RISEDRONATE DE CALCIUM

Partie A

Synthèse et caractérisation des phosphates de calcium

I- INTRODUCTION

Les minéralisations des tissus calcifiés des vertébrés (os et dents) sont constituées de cristaux phosphocalciques de structure apatitique. Le mauvais état de cristallisation, les dimensions nanométriques des cristaux (à l'exception de l'émail dentaire), et leur étroite association avec la matrice organique rendent cependant difficile l'étude de la réactivité du minéral osseux dans le milieu naturel et ouvrent souvent la voie à des interprétations faiblement étayées. La plupart des progrès réalisés dans la connaissance des minéralisations biologiques ont eu pour moteur l'étude des analogues de synthèse. Ces apatites synthétiques se révèlent en outre indispensables pour l'étude des différents processus liés aux propriétés des apatites naturelles et leur réactivité vis-à-vis du milieu environnant (Hina, 1996).

Les méthodes de préparation des apatites phosphocalciques peuvent être subdivisées en deux groupes (Elliott, 1994):

- La voie sèche qui met en jeu des réactions à haute température entre composés solides,

- La voie humide qui se caractérise par l'utilisation de solvants. Cette procédure englobe : (1) synthèse hydrothermale, (2) procédé sol-gel, (3) neutralisation de l'acide phosphorique par la chaux, et (4) synthèse par double décomposition.

Pour la préparation de nos échantillons, nous avons utilisé la méthode double décomposition en milieu aqueux. Cette méthode est largement employée pour l'élaboration d'apatites phosphocalciques utilisées notamment comme biomatériaux orthopédiques et également des apatites de basse cristallinité qui s'apparentent au minéral osseux. Elle offre l'avantage (Barroug, 1989) de permettre le contrôle des différents paramètres physico-chimiques qui déterminent les caractéristiques structurales, morphologiques et superficielles des composés apatitiques: (pH des solutions, température, vitesse de précipitation, concentrations des sels de départ, rapport solution/solide, durée de précipitation, conditions de lavage et de séchage); en outre, cette méthode donne lieu à des solides de composition connue.

Les caractéristiques physico-chimiques des apatites influent considérablement sur les propriétés interfaciales de ces matériaux (Barroug, 1989; Ouizat, 2000). En

outre, une interprétation précise des phénomènes se produisant à l'interface solution-solide nécessite une bonne connaissance des propriétés texturales et superficielles des adsorbants. Il nous a donc paru important d'une part, de décrire de façon détaillée la méthode de préparation de nos échantillons, et de préciser d'autre part, les caractéristiques de chaque support utilisé dans la suite de cette étude.

Dans le présent chapitre nous décrivons l'élaboration et la caractérisation d'apatites phosphocalciques impliquées dans l'élaboration de biomatériaux:

- Hydroxyapatite: stœchiométrique et bien cristallisée, ce matériau est considéré comme prototype minéral des os et des dents et entre dans la composition des biomatériaux les plus utilisés (Aoki, 1994; Dorozhkin and Epple, 2002).

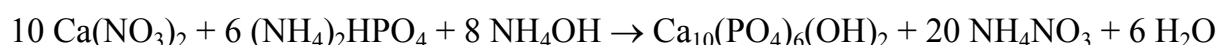
- Apatites nanocristallines: non-stœchiométriques et mal cristallisées, ces composés se caractérisent par une composition et une structure similaire au minéral osseux. Ces supports jouent un rôle primordial dans les phénomènes de biominéralisation et sont utilisées comme biominéraux bioactifs destinés aux applications orthopédiques (Rey et al., 2007b). Le processus de maturation de ces composés a été examiné.

- Phosphates octocalciques apatitiques: de composition chimique proche de celle du phosphate octocalcique triclinique, ces composés, en raison de leur aptitude remarquable à la compaction, sont utilisés comme support de médicaments implantables à libération retardée (Lebugle et al., 2002).

II- HYDROXYAPATITE STOECHIOMETRIQUE

II-1- Synthèse

Le composé stœchiométrique (HA) a été préparé selon la méthode de double décomposition; celle-ci consiste à effectuer, à température voisine de 90°C, une précipitation relativement lente (3 heures) en milieu basique entre une solution de nitrate de calcium et une solution de phosphate d'ammonium (Trombe, 1972). La composition des solutions a été choisie à partir des coefficients stœchiométriques correspondant à l'équation suivante:



La composition des solutions réactant est la suivante :

- Solution cationique : 262,3 g (1,11 mol) de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 1100 ml d'eau permutée décarbonatée.

- Solution anionique : 88 g (0,66 mol) d'hydrogénophosphate diammonique $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ sont dissous dans 433 ml d'eau permutée décarbonatée.

La solution cationique a été portée à ébullition puis additionnée de 80 ml d'ammoniaque concentré ($d = 0,91$). La solution anionique a été ensuite ajoutée goutte à goutte à l'aide d'une pompe péristaltique pendant 3 heures, avec une vitesse d'agitation maintenue constante à $150 \text{tr} \cdot \text{min}^{-1}$. La présence d'ammoniaque en excès est nécessaire pour maintenir le milieu basique ($\text{pH} = 9$). Une fois la préparation terminée, le mélange est maintenu à ébullition et sous agitation pendant une demi-heure.

Le précipité obtenu est filtré à chaud sur büchner puis lavé abondamment par de l'eau permutée décarbonatée. Il est ensuite congelé puis lyophilisé pendant 3 jours.

II-2- Caractérisation

II-2-1- Diffraction des rayons X

Le diagramme de DRX du précipité préparé dans les conditions de synthèse examinées (Figure II-1) montre des raies fines et résolues, caractéristiques d'une apatite bien cristallisée. Le solide préparé est minéralogiquement pur; en effet, aucune phase étrangère autre que l'apatite n'a été décelée. Les dimensions apparentes des cristallites ont été obtenues à partir de la relation de Scherrer (1918). Les mesures ont été réalisées sur les raies qui permettent de déterminer les dimensions apparentes des cristaux suivant deux axes perpendiculaires : l'axe c de la maille hexagonale (002) et un plan perpendiculaire (310). Les valeurs obtenues pour les deux raies examinées (002) et (310) sont respectivement 574 et 275 Å. Ces valeurs montrent que les cristaux de HA sont allongés selon l'axe c ($L_{(002)} > L_{(310)}$).

II-2-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF)

La figure II-2 présente le spectre IR de l'apatite synthétisée. Les attributions ainsi que les intensités relatives des bandes de vibrations observées sont consignées dans le tableau II-1.

On note la présence de bandes attribuables à des molécules d'eau (vers 3500 cm^{-1}), des ions hydroxyle OH^- (630 et 3570 cm^{-1}) ainsi que des bandes dues aux vibrations des groupements phosphate PO_4^{3-} (vers 1000 - 1100 cm^{-1} et 560 et 600 cm^{-1}) caractéristiques d'environnements apatitiques. On observe également une bande de faible intensité à 875 cm^{-1} ainsi que deux épaulements vers 1140 et 1230 cm^{-1} , correspondant à des groupements hydrogénophosphate HPO_4^{2-} ; la présence de ces espèces en faible quantité, substituées aux groupements PO_4^{3-} , atteste que l'apatite préparée est légèrement sous stoechiométrique.

Tableau II-1: Positions et intensités des bandes IR de HA (m: moyenne; f: faible ép: épaulement ; F : forte ; l: large).

Position (cm⁻¹) et intensité des bandes IR	Attributions
3000-3400 (m)	Elongation symétrique et antisymétrique des molécules d'eau
3570 (ép)	Elongation symétrique des ions OH ⁻ mode ν_s
1630 (f)	Déformation des molécules d'eau
1087 (F,l) 1046 (F,l)	Elongation antisymétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_3 (F ₂)
962 (m)	Elongation symétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_1 (A ₁)
875 (f) 633 (F)	Elongation P-OH des groupements HPO ₄ ²⁻ Libration ν des OH ⁻
571 (F) 601 (F)	Déformation antisymétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_4 (F ₂)
474 (f)	Déformation symétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_2 (E)

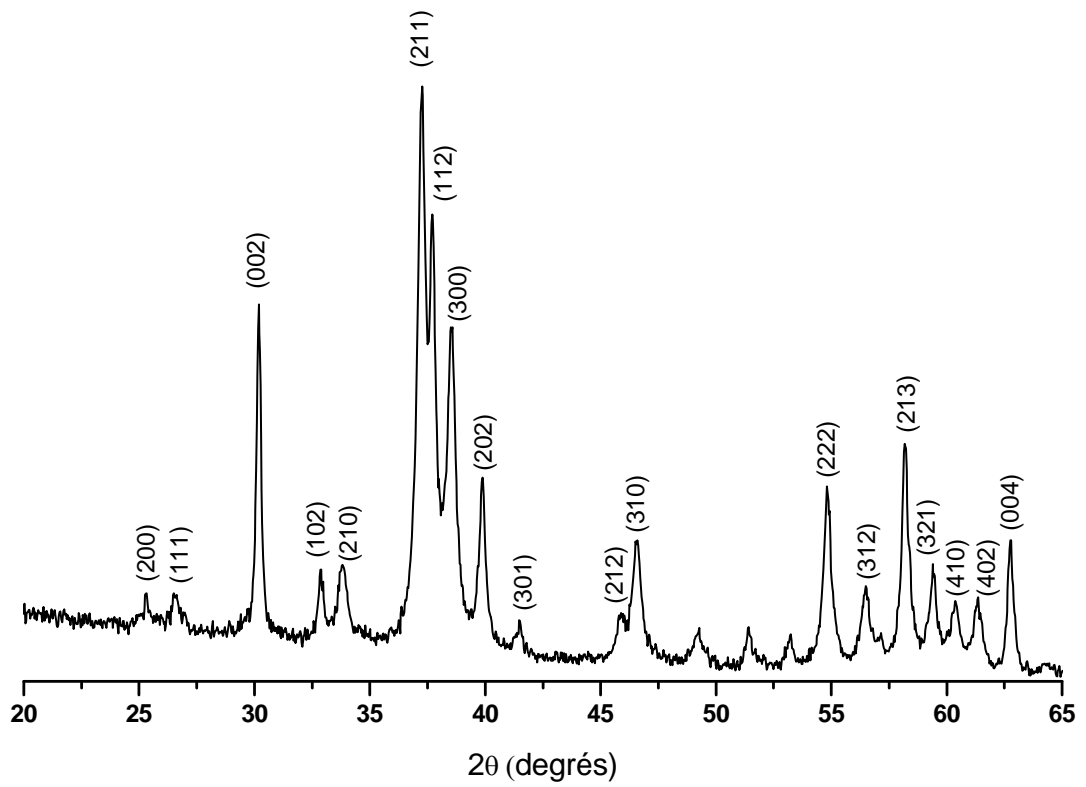


Figure II-1: Diagramme de diffraction de rayons X de HA.

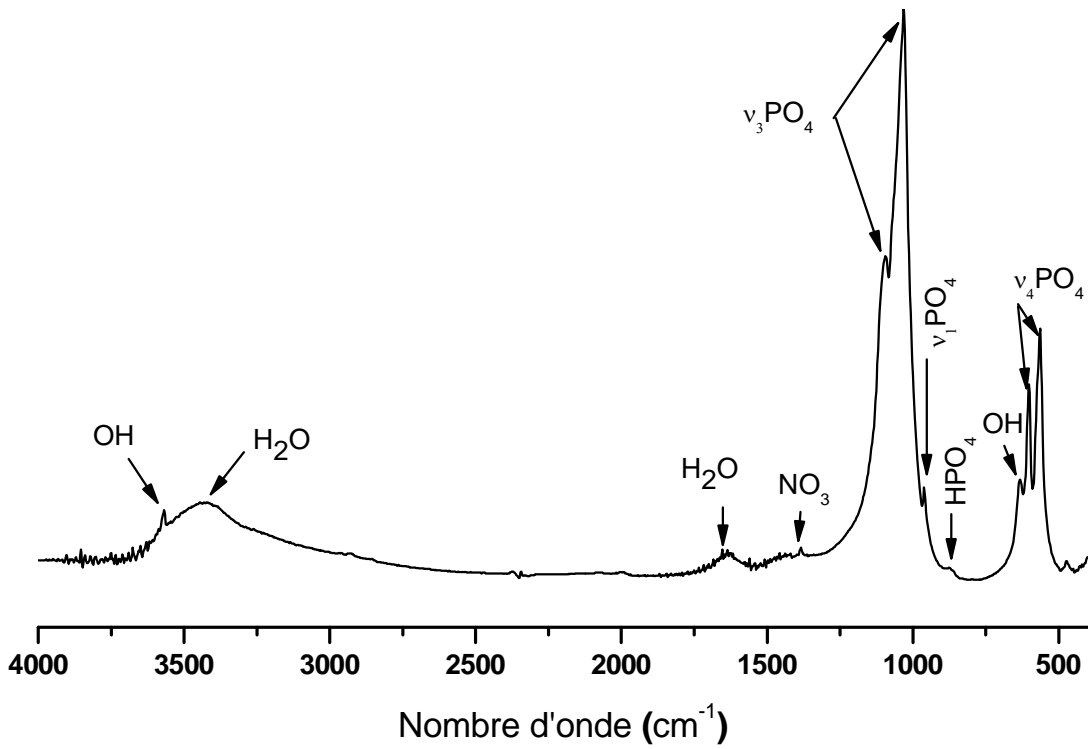


Figure II-2: Spectre Infrarouge de HA.

II-2-3- Spectrométrie par diffusion Raman

Le spectre Raman réalisé sur la poudre de l'échantillon préparé présente des modes de vibrations typiques d'une hydroxyapatite stœchiométrique (Figure II-3). Les bandes dans les domaines 430-450, 570-629 et 1020-1080 cm^{-1} correspondent respectivement aux modes $\nu_2 \text{PO}_4$, $\nu_4 \text{PO}_4$ et $\nu_3 \text{PO}_4$ des groupements phosphate de l'apatite. La bande la plus intense à 964cm^{-1} est assignée à $\nu_1 \text{PO}_4$.

II-2-4- Spectroscopie RMN de l'état solide (^1H SPE-MAS et ^{31}P SPE-MAS)

Les mesures de RMN du ^1H du ^{31}P en impulsion unique (SPE: Single Pulse Excitation) et polarisation croisée (CP: Cross Polarization) $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ et $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$, combinées à la rotation à l'angle magique (MAS: Magic Angle Spinning) et au découplage haute puissance des ^1H , ont été réalisées respectivement à 500,13 et 202,47 MHz à l'aide d'un spectromètre Bruker ASX 500 opérant dans un champ magnétique de 11.7 T. Les rotors utilisés sont de zirconium ($\varnothing = 4 \text{ mm}$) et la vitesse de rotation MAS est comprise entre 12 et 14 kHz selon les échantillons. La durée entre chaque accumulation (D1) est de 10 s pour le ^1H , 350 s pour le ^{31}P et 100 s pour le ^{13}C en accord avec les temps de relaxation spin réseau respectifs de ces spins.

Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au tétraméthylesilane (TMS) pour le ^1H et à l'acide phosphorique à 85 % (H_3PO_4) pour le ^{31}P .

Les spectres ^1H SPE-MAS et ^{31}P ^1H SPE-MAS obtenus sur HA sont indiqués sur la figure II-4. Le spectre ^1H SPE-MAS montre essentiellement deux pics à 0,2 et 5,5 ppm attribués respectivement aux ions OH^- dans les tunnels apatitiques et à l'eau structurale et/ou adsorbée (Wilson et al., 2006).

Le spectre RMN ^{31}P SPE-MAS est constitué d'un seul pic centré à 2,6 ppm relatif aux groupements orthophosphates de l'apatite.

II-2-5- Analyse chimique et surface spécifique

Les résultats de l'analyse chimique indiquent que le précipité présente un rapport atomique Ca/P (1,64) légèrement inférieur à celui de l'hydroxyapatite stœchiométrique (1,67). Il s'agit d'une apatite légèrement déficiente en calcium; cette observation est compatible avec la présence d'ions hydrogénophosphate dans le spectre IR correspondant. La surface spécifique du solide élaboré, déterminée par la méthode Brunauer-Emmett-Teller (BET), est de l'ordre de $59 \text{ m}^2/\text{g}$. Cette valeur est généralement observée pour des apatites préparées dans les mêmes conditions (Ouizat, 2000; Barroug, 1989).

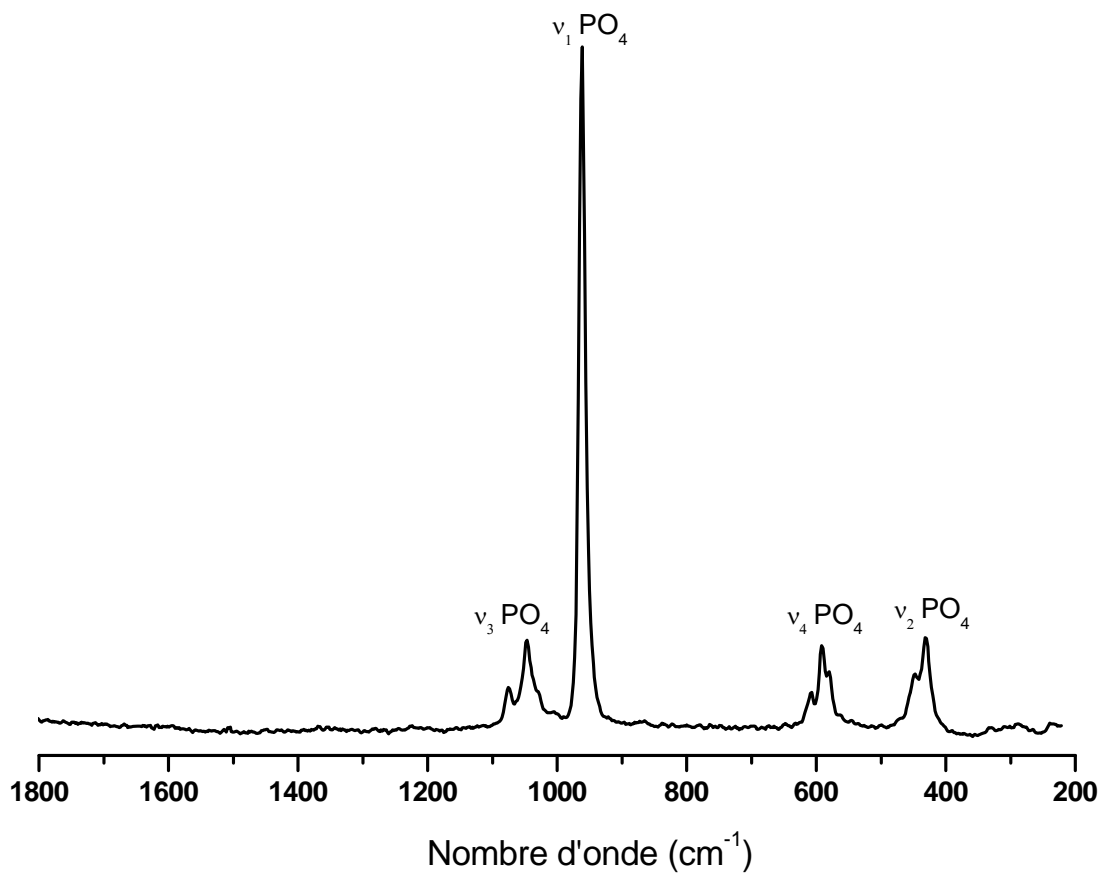


Figure II-3: Spectre de diffusion Raman de HA

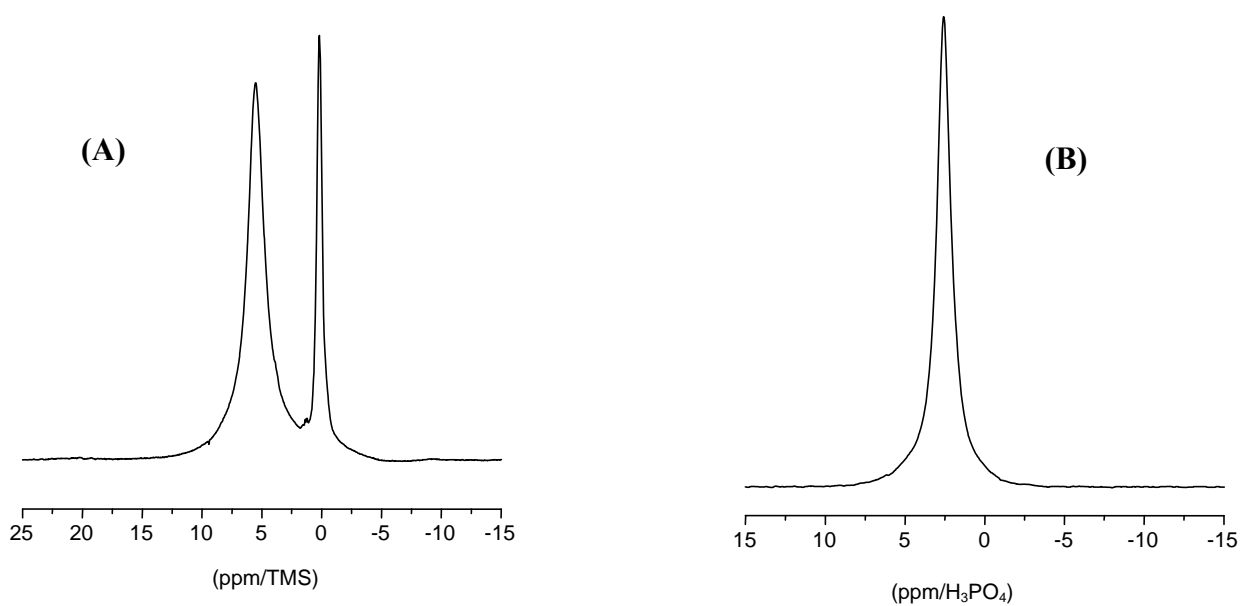


Figure II-4: Spectres ^1H SPE-MAS (A) et ^{31}P SPE-MAS (B) de HA.

III-APATITES NANOCRISTALLINES CARBONATEES (ANC)

III-1- Synthèse

Les analogues de synthèse au minéral osseux ont été obtenus par double décomposition à température ambiante entre une solution de nitrate de calcium et une solution de phosphate d'ammonium et de bicarbonate de sodium.

L'un des principaux avantages de cette méthode, outre sa mise en œuvre aisée, réside dans le fait que le pH reste constant; la solution de synthèse est tamponnée par un grand excès de phosphate et de carbonate largement supérieur à la quantité stœchiométrique. De plus, cette procédure restreint fortement l'apparition de phases étrangères au cours de la précipitation et assure une assez bonne reproductibilité.

Les solutions de synthèse ont la composition suivante:

- Solution cationique: 52,2 g (0,22 mol) de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 750 ml d'eau permutée.

- Solution anionique : 90 g (0,68 mol) de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ainsi que 90 g (1,07 mol) de NaHCO_3 sont dissous dans 1500 ml d'eau permutée.

La solution cationique a été versée rapidement à température ambiante ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) dans la solution anionique. La suspension obtenue est agitée durant quelques secondes afin d'assurer l'homogénéité; le pH mesuré est proche de 7,4. Le précipité formé est ensuite laissé mûrir sans agitation, dans des récipients totalement hermétiques afin d'éviter toute perte (ou fixation) du gaz carbonique.

Après des durées de maturation de 1 jour, 6 jours, et 30 jours, les précipités sont filtrés sur büchner, lavés soigneusement plusieurs fois avec de l'eau permutée décarbonatée, lyophilisés puis stockés au congélateur (-18°C) afin d'éviter toute évolution. Les solides préparés sont ainsi désignés ANC-1j, ANC-6j et ANC-30j.

III-2- Caractérisation

III-2-1- Diffraction des rayons X

Tous les précipités formés à différents temps de maturation fournissent des diagrammes semblables où on observe des raies larges et mal résolues caractéristiques d'apatites phosphocalciques nanocristallines, similaires à la phase minérale du tissu osseux (Figure II-5). Par ailleurs, aucune phase cristalline outre que l'apatite n'a été décelée dans nos préparations.

Le Tableau II-2 regroupe les dimensions apparentes des cristallites, calculées à partir de la formule de Scherrer. Nous remarquons tout d'abord que les cristaux de l'ensemble des échantillons sont allongés selon l'axe c ($L_{(002)} > L_{(310)}$). Les dimensions

des cristaux préparées sont comparables à celles calculées pour un os humain d'un adulte (Hina, 1996). On note également que les dimensions (longueur et largeur) augmentent légèrement avec le temps de maturation. Des observations similaires ont été rapportées pour des apatites préparées dans des conditions semblables (Hina, 1996; Cazalbou, 2000; Ouizat, 2000).

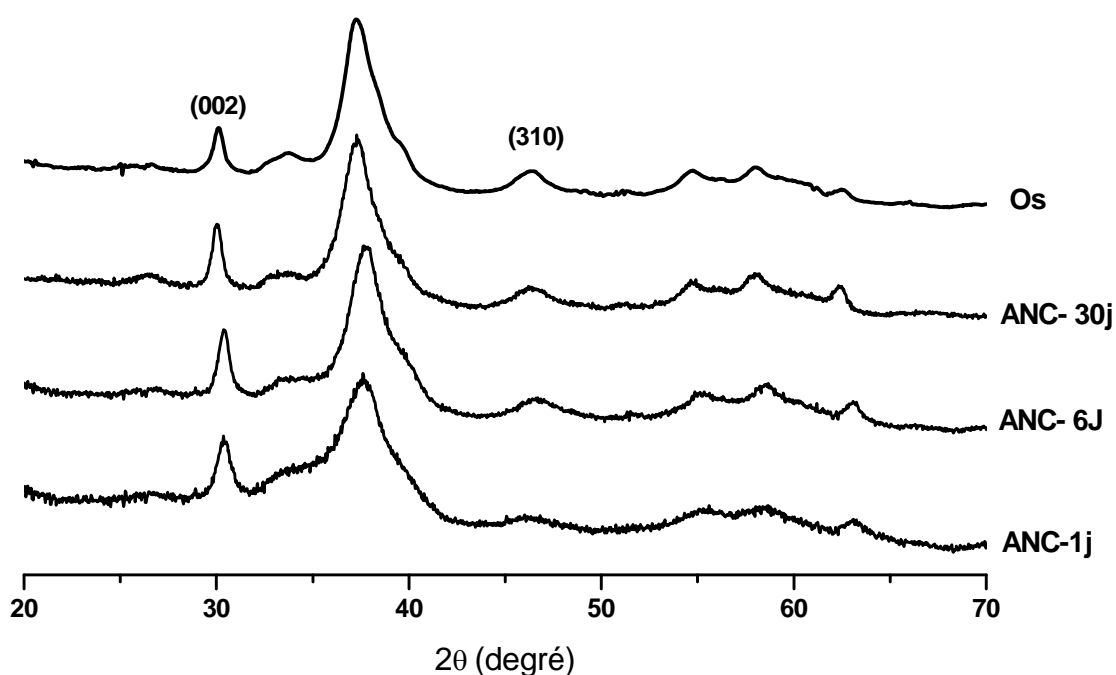


Figure II-5: Diagrammes de DRX des apatites préparées à différents temps de maturation.

Tableau II-2: Dimensions apparentes des cristallites d'apatites préparées en fonction du temps de maturation

Echantillon	Dimensions apparentes des cristallites		
	$L_{(002)} \pm 5 \text{ \AA}$	$L_{(310)} \pm 5 \text{ \AA}$	$L_{(002)}/L_{(310)}$
ANC-1j	242	86	2,8
ANC-6j	295	90	3,3
ANC-30j	349	98	3,6
Os humain d'adulte*	213	68	3,1

*Hina, 1996

III-2-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF)

Les spectres d'absorption infrarouge des solides préparés à différents temps de maturation sont caractéristiques d'apatites nanocristallines carbonatées (Figure II-6), en accord avec la basse cristallinité des solides observée par DRX. Les positions des différentes bandes observées ainsi que leurs attributions sont regroupées dans le tableau II-3.

Tableau II-3: Position et intensité des bandes IR des apatites nanocristallines synthétisées.

Position (cm⁻¹) et intensité des bandes IR	Attributions
3000-3400 (F,l)	Elongation symétrique et antisymétrique de molécules d'eau
1644 (f)	Déformation des molécules d'eau
1476 (m) 1419 (m)	Elongation C-O des ions CO ₃ ²⁻ mode ν_3
1380-1400 (f)	Elongation N-O des ions NO ₃ ⁻
1140	Elongation P-OH des groupements HPO ₄ ²⁻
1093 (F,l) 1033 (F,l)	Elongation antisymétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_3 (F ₂)
961 (m)	Elongation symétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_1 (A ₁)
878 (f) 871 (ep)	Elongation C-O des ions CO ₃ ²⁻ mode ν_2
604 (F) 563 (F)	Déformation antisymétrique des ions PO ₄ ³⁻ mode ν_4 (F ₂)

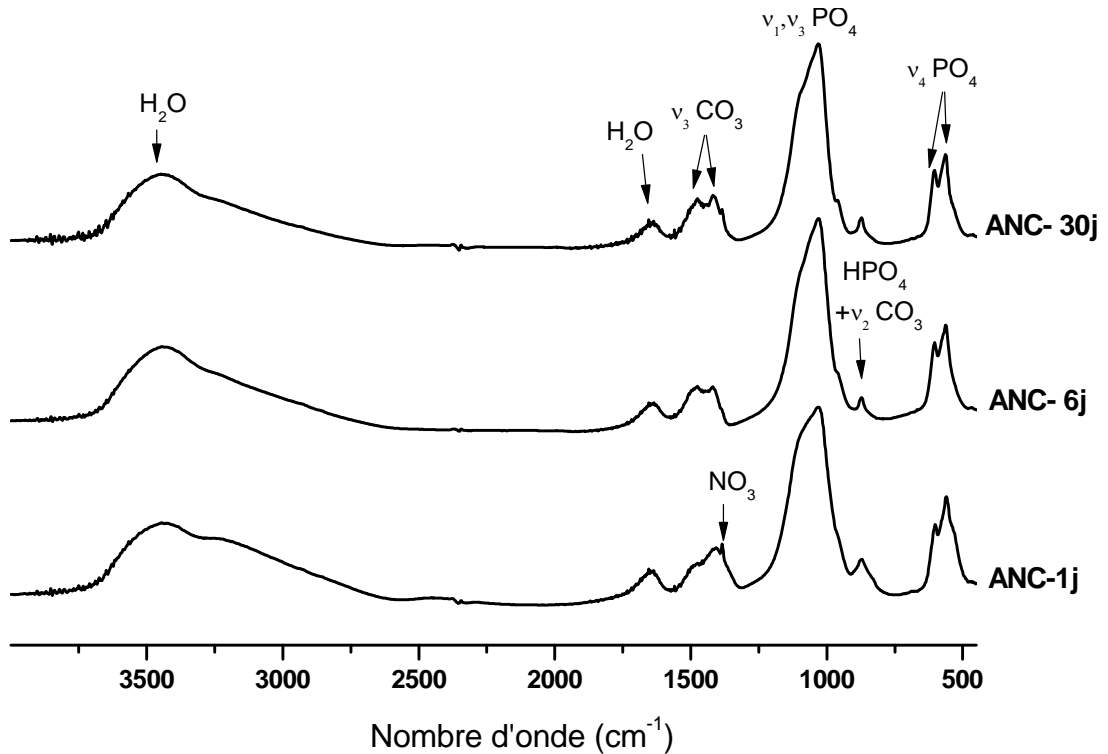


Figure II-6: Spectres IR d'apatites obtenues à différentes durées de maturation

La bande large et intense dans le domaine $3000\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ témoigne de la présence d'eau adsorbée à la surface des nanocristaux ou éventuellement d'eau intracristalline (LeGeros et al., 1978). Les bandes dans les domaines $1000\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ et $550\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ correspondent respectivement aux modes $\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$ et $\nu_4\text{ PO}_4^{3-}$ des groupements phosphate situés dans des sites apatitiques. La bande à 961 cm^{-1} est assignée à $\nu_1\text{ PO}_4^{3-}$. L'épaule vers 1140 cm^{-1} est attribuée aux ions HPO_4^{2-} dans le réseau apatitique.

Les modes ν_3 et ν_2 des groupements carbonate apatitiques apparaissent respectivement dans les domaines $1350\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ et $850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$. Le premier domaine met en évidence deux bandes vers 1419 cm^{-1} et 1476 cm^{-1} caractéristiques d'ions carbonate localisés dans les sites PO_4^{3-} (carbonate type B) (Rey et al., 1989b; Elliott, 1994). La deuxième région spectrale ($850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) fait apparaître une bande à 871 cm^{-1} attribuée aux vibrations des carbonates type B, et un épaule vers 879 cm^{-1} attribué aux carbonates qui occupent les sites monovalents de la structure apatitique (carbonate type A) (Elliott, 1994; Vignoles, 1984). Ces observations indiquent qu'il s'agit d'apatites nanocristallines carbonatées mixtes de type AB.

Afin de mieux mettre en évidence l'évolution des spectres IR des solides lors du processus de maturation, nous avons procédé à la décomposition des principales bandes d'absorption d'ions carbonate $850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_2\text{ CO}_3$) et d'ions phosphate entre 480 et 660 cm^{-1} ($\nu_4\text{ PO}_4$). Pour cela, nous avons opéré par des traitements

mathématiques de décomposition sur les régions spectrales sélectionnées en utilisant le logiciel GRAMS/AI version 8.0. Ces décompositions, conformément aux différents travaux effectués dans ce domaine (Rey et al., 1991a,b et 1995b), ont été effectuées en considérant une forme de bande lorentzienne pour chaque bande IR.

Les attributions des bandes correspondant aux domaines ν_4 PO₄ et ν_2 CO₃ sont illustrées respectivement sur les figures II-7 et II-8. Dans le domaine ν_4 PO₄, on note la présence de bandes spécifiques aux groupements HPO₄²⁻ et PO₄³⁻ non-apatitiques situées à 535 et 550 cm⁻¹. La décomposition dans le domaine ν_2 CO₃ fait apparaître, en plus des bandes spécifiques aux ions carbonate type A et B, une bande large vers 866 cm⁻¹ caractéristique des espèces carbonate labiles. Le rapport des aires des bandes des espèces PO₄ non-apatitique, HPO₄ apatitique et HPO₄ non-apatitique, par rapport à l'aire de l'ensemble de la bande phosphate, a été calculé. Nous avons procédé de la même manière pour les espèces carbonate (CO₃ de type A, CO₃ de type B et CO₃ labiles).

L'évolution de l'environnement des ions phosphate au cours de la maturation est reportée sur la figure II-9. On assiste à une diminution significative de la proportion de groupements HPO₄ non-apatitiques après 6 jours de maturation, et à une augmentation de la quantité relative aux ions HPO₄²⁻ apatitiques, tandis que la proportion des groupements phosphate labiles évolue faiblement. La diminution de la teneur en ions HPO₄²⁻ labiles semble liée à l'augmentation progressive mais relative de la proportion des groupements HPO₄²⁻ apatitiques. Des évolutions identiques ont été rapportées pour la maturation d'apatites nanocristallines carbonatées (Hina, 1996; Cazalbou, 2000). Cette diminution serait due à une substitution partielle des ions phosphate par des groupements carbonate (Rey et al., 1995c).

Par ailleurs, sur la base des variations des quantités relatives aux espèces carbonate lors de la maturation (Figure II-10), on assiste à l'augmentation des carbonates de type B et de type A, alors que la quantité en carbonate dans les environnements labiles (situés à la surface) diminue. Ces évolutions montrent clairement une redistribution des ions carbonate, durant la maturation, de la surface des cristaux vers les sites apatitiques les plus stables.

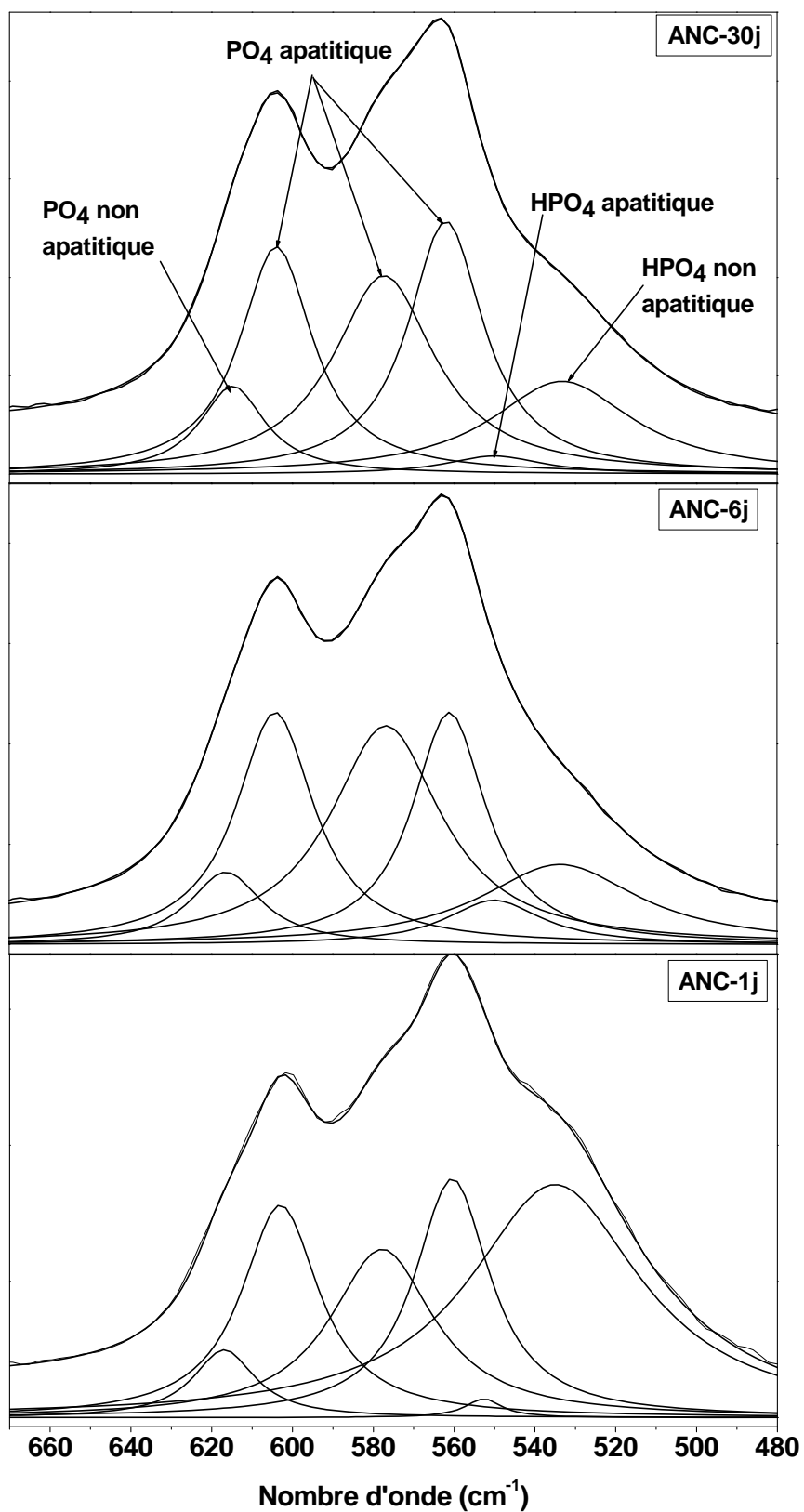


Figure II-7: Décomposition des bandes ν_4 PO₄ (480-670 cm⁻¹).

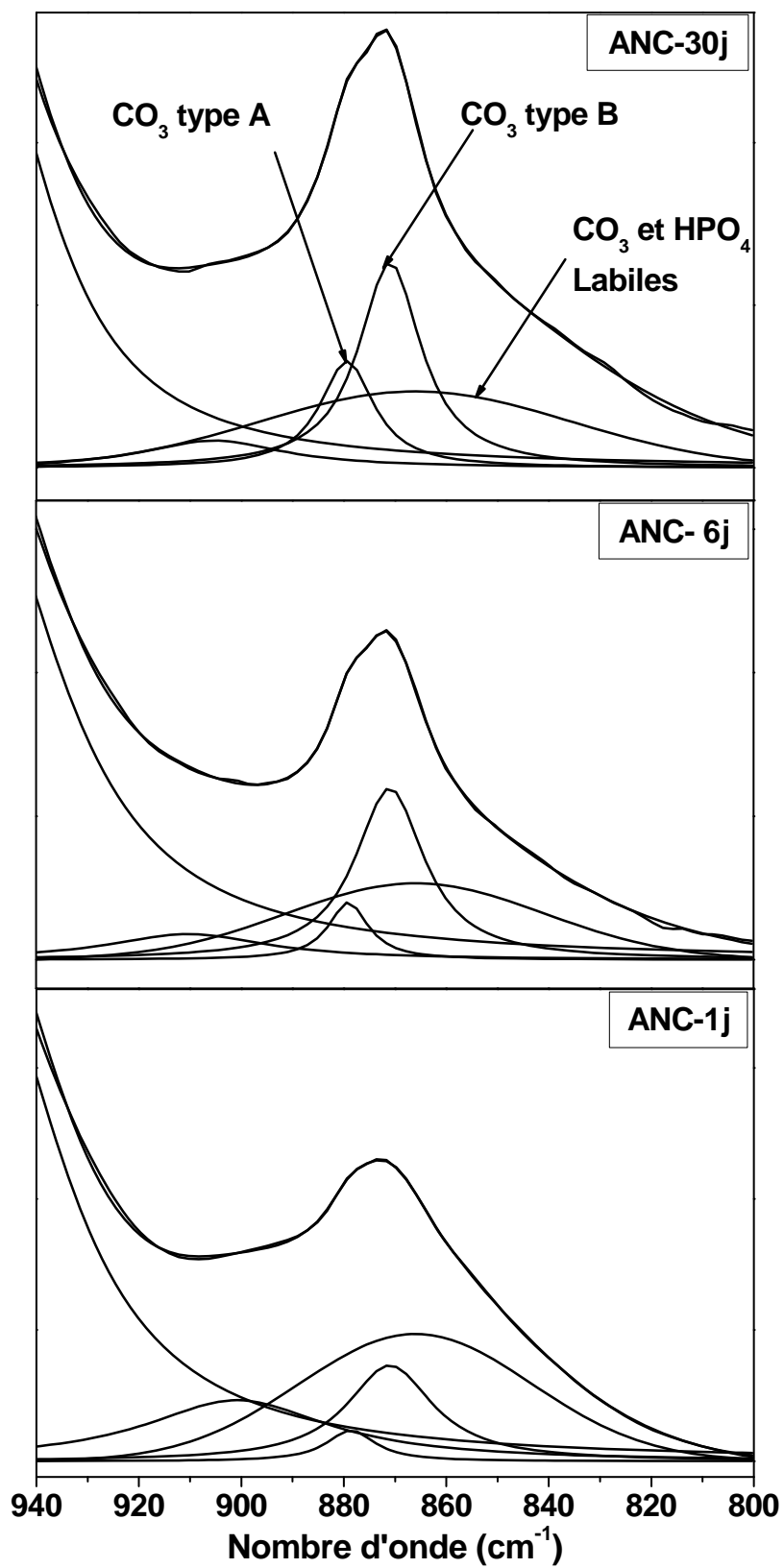


Figure II-8: Décomposition des bandes ν_2 CO₃ (900-850 cm⁻¹)

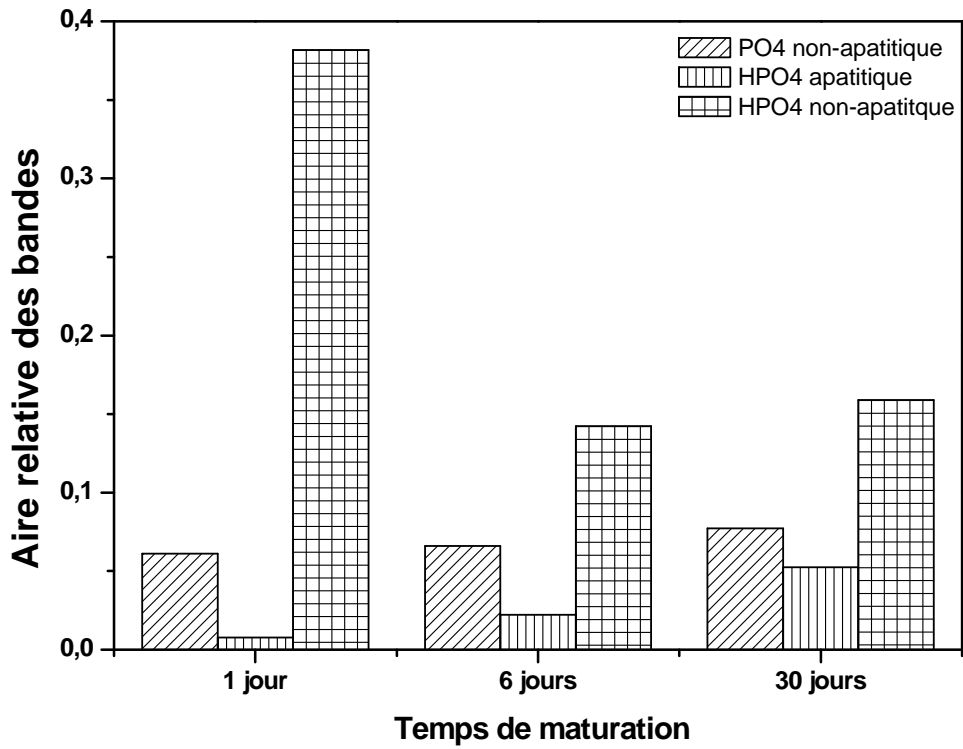


Figure II-9 : Evolution des quantités relatives des ions phosphate au cours de la maturation.

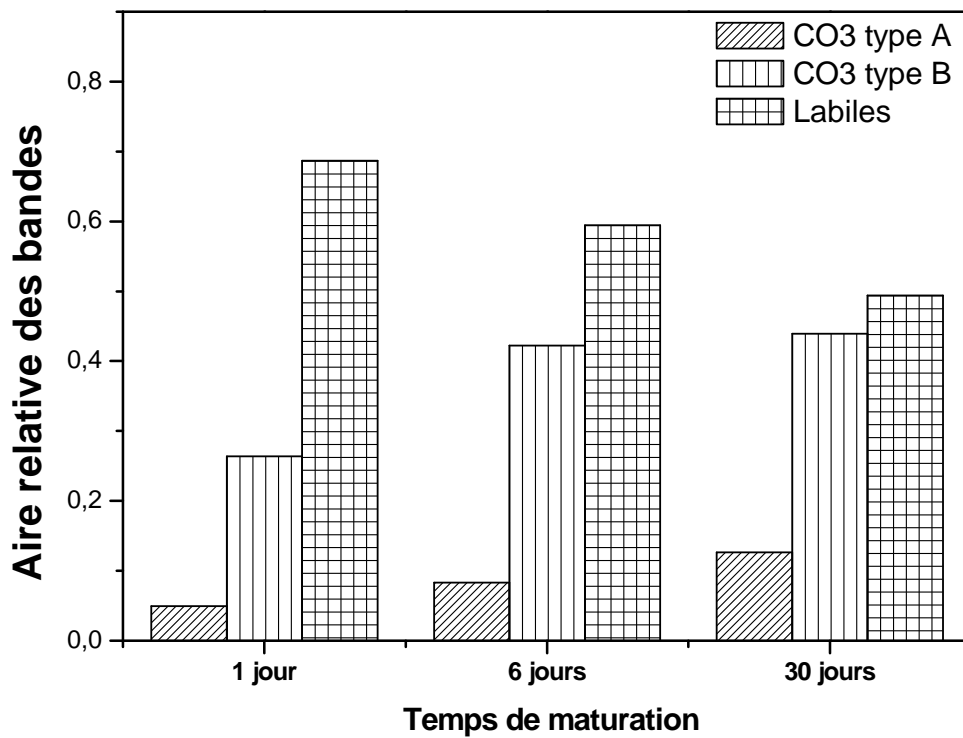


Figure II-10 : Evolution des intensités relatives des bandes IR des ions carbonate au cours de la maturation.

III-2-3- Spectrométrie par diffusion Raman

Les spectres de diffusion Raman des précipités obtenus à différents temps de maturation (Figure II-11) mettent en évidence la présence de bandes de vibrations de groupements phosphate caractéristiques d'apatites carbonatées mal cristallisées. Les attributions des bandes observées sont consignées dans le tableau II-4.

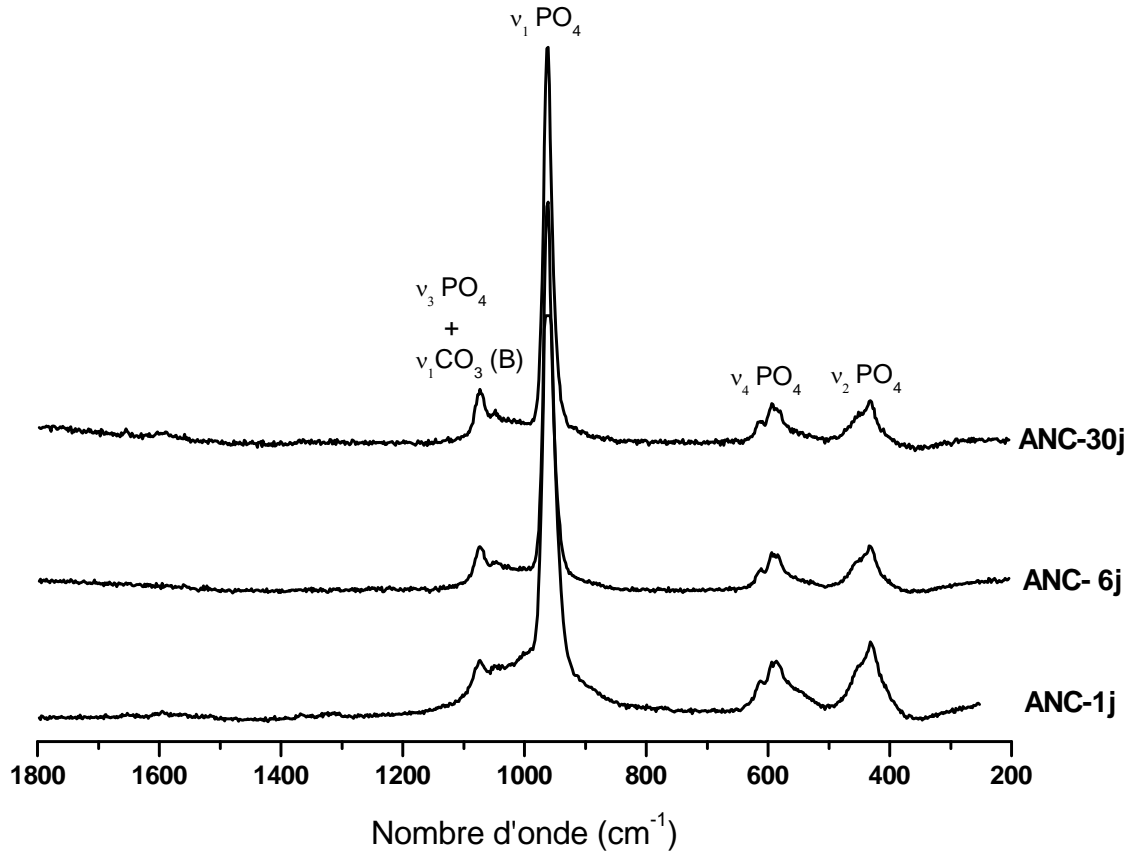


Figure II-11: Spectres de diffusion Raman des précipités obtenus à différentes durées de maturation.

Tableau II-4: Attribution des bandes caractéristiques des apatites nanocristallines carbonatées analysées par Raman.

	ANC-1j	ANC-6j	ANC-30j	Os*	Email*
$\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$	429	430	430	432	433
	450	450	450	452	450
$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$	590	590	590	590	588
	609	609	609	611	608
$\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$	961	961	961	959	961
$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$	1046	1046	1046	1044	1043
	1071-1072	1071-1072	1071-1072	1071	1071
$\nu_1 \text{CO}_3^{2-}$ (B)	1071-1072	1071-1072	1071-1072	1071	1071

* (Penel et al., 2003)

III-2-4- Spectroscopie RMN de l'état solide

(^1H SPE-MAS, ^{31}P SPE-MAS et $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CP-MAS)

Les spectres ^1H SPE-MAS des apatites préparées (Figure II-12 (A)) exhibent un pic intense à $\sim 5,4$ ppm caractéristique de l'eau structurale et/ou adsorbée (Wilson et al., 2006). Le pic de très faible intensité situé vers 0,2 ppm est attribué aux ions OH^- localisés dans les tunnels apatitiques (Panda et al., 2003). L'intensité de ce pic (0,2 ppm) est extrêmement faible et augmente légèrement avec la durée de maturation. Il est à noter que ni la spectroscopie IR, ni la spectroscopie Raman n'ont révélé la présence d'ions OH^- . Cela est probablement dû à leur faible teneur. En effet, il est bien connu que ces deux techniques ne permettent pas de détecter ces ions lorsque leur teneur n'excède pas les 5 %. La présence probable de carbonates de type A (substitués partiellement aux ions OH^-) serait à l'origine de la faible concentration d'ions OH^- dans le tunnel apatitique, même si la plupart des carbonates contenus dans ces échantillons sont de type B (substitution partielle au niveau des groupements phosphates). Ce type de résultat a déjà été rapporté par Labarthe et Bonel (1973). En effet ces auteurs avaient observé une réduction considérable de la concentration en ions OH^- lorsque des ions carbonate sont incorporés dans le tunnel apatitique. Nous reviendrons plus en détail, dans les paragraphes suivants, sur la présence éventuelle d'ions carbonate dans le tunnel apatitique des échantillons étudiés dans ce travail.

La présence d'ions OH⁻ dans le tunnel apatitique signifierait donc l'existence dans la structure de ces échantillons de domaines ayant des environnements analogues à ceux des apatites stoechiométriques. En plus des pics attribués aux ions OH⁻ dans le tunnel apatitique (0,2 ppm) et aux molécules d'eau (~ 5,4 ppm), le spectre ¹H SPE-MAS de l'apatite maturée un jour (ANC-1j) fait apparaître deux épaulements dont un relativement large centré autour de 14 ppm et l'autre à ~ 7,2 ppm. Si le premier, qui apparaît également dans les spectres ¹H SPE-MAS des apatites maturées 6 jours (ANC-6j) et 30 jours (ANC-30j) mais avec une intensité beaucoup plus faible (Figure II-12 (A)), est attribuable sans ambiguïté aux ions hydrogèno-phosphate (HPO₄²⁻), le pic à 7.2 ppm peut correspondre aussi bien à des molécules d'eau fortement adsorbées ou proches des ions HPO₄²⁻ qu'à des ions ammonium (NH₄⁺) piégés dans le réseau lors de la préparation de l'échantillon tel rapporté dans le cas des fluoroapatites carbonatées et faiblement hydroxylées (Sfih et Rey, 2002). Toutefois, étant donné l'intensité relativement élevée de ce pic et son absence dans les spectres ¹H SPE-MAS des apatites maturées 6 et 30 jours, cette dernière hypothèse paraît peu probable.

La diminution de l'intensité du pic à 14 ppm lorsqu'on passe de l'apatite maturée 1 jour à celles maturées 6 et 30 jours traduirait une diminution de la concentration en ions HPO₄²⁻ avec la durée de maturation des échantillons. Par ailleurs, l'examen détaillé de ce pic (Figure II-12 (A)) révèle en fait une structure à deux pics centrés à ~12,5 et ~ 15,5 ppm particulièrement visibles dans le spectre de l'apatite maturée un jour. L'existence de ces deux pics met ainsi en évidence la présence dans ces apatites de deux types d'ions HPO₄²⁻ caractérisés par des environnements différents. Toutefois, le pic à 15,5 ppm semble totalement disparaître des spectres des deux apatites maturées à 6 et 30 jours.

La présence du pic à ~ 15,5 ppm dans le spectre ¹H SPE-MAS de l'apatite maturée un jour est probablement lié au pic supplémentaire de l'eau qui apparaît à 7,5 ppm, car ces deux pics disparaissent totalement (ou tout au moins leur intensités sont considérablement réduites) des spectres des deux apatites maturées pendant 6 et 30 jours. Ce résultat conforterait ainsi l'attribution du pic à 7.5 ppm à des molécules d'eau dans l'environnement des ions HPO₄²⁻ et plus précisément de ceux localisés à ~ 15,5 ppm.

Afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse avancée précédemment sur la présence éventuelle d'ions carbonate dans le tunnel apatitique (carbonates de type A), des mesures ¹³C SPE-MAS et ¹H→¹³C CP-MAS ont été réalisées sur les trois échantillons. La figure II- 13 (A) montre les spectres ¹H→¹³C CP-MAS obtenus avec un temps de contact de 2 ms. On constate que quel que soit la durée de maturation, le spectre contient une raie dont la position (~ 169 ppm) correspond à celle des

carbonates de type B (Beshah et al., 1990; Sfihi et Rey, 2002) et un épaulement vers 166 ppm, dont l'intensité relative ne semble pas évoluer de façon significative avec le temps de maturation, attribué aux carbonates de type A (Beshah et al., 1990). Ainsi, la présence d'ions OH⁻ apatitique, même à faible concentration, signifierait donc l'existence dans la structure de ces échantillons de petits domaines ayant des environnements analogues à ceux des apatites stœchiométriques. Par ailleurs et concernant la raie des carbonates de type B, des mesures en ¹H→¹³C CP-MAS réalisées à différents temps de contact sur l'apatite maturée un jour (Figure II-13 (B)) révèlent l'existence de deux types de ces carbonates. En effet, au fur et à mesure que le temps de contact augmente la largeur de la raie diminue. Cette diminution, qui s'accompagne d'un déplacement du centre de gravité de la raie vers les bas champs magnétiques, est davantage accentuée lorsqu'on passe au spectre ¹³C SPE-MAS (Figure II-13 (C)). Ce résultat ne peut s'expliquer que par la présence de deux types de carbonates de «type B» dont les carbones correspondant seraient caractérisés par des temps de polarisation différents. Des résultats similaires ont déjà été rapportés dans la littérature sur une fluorapatite carbonatée et faiblement hydroxylée (Sfihi et Rey, 2002). Ces deux types de carbonates ont été attribués à des carbonates de type B (localisés à haut champs magnétique) et à des carbonates labiles (localisés à bas champs magnétique). Ces derniers seraient donc polarisés essentiellement par les protons des molécules d'eau adsorbées en surface, ce qui expliquerait leur polarisation beaucoup plus rapide que celle des carbonates de type B. Toutefois, sur la base des mesures 2-D HetCor (Hetero-Correlation Chemical Shift), comme on le verra de façon détaillée au chapitre IV, les carbonates de type B sont polarisés par les mêmes protons que ceux qui polarisent les ¹³C associés aux carbonates labiles, c'est-à-dire les protons des molécules d'eau adsorbées en surface. Par ailleurs, en SPE-MAS tous les carbones sont détectés alors qu'en CP-MAS seuls ceux dans le voisinage immédiat des protons le sont; sur la base de la largeur de la raie observée par ces deux méthodes, on déduit que la proportion de carbonates labiles est beaucoup plus faible que celle des carbonates de type B (*la raie obtenue en SPE-MAS serait dominée par les carbonates de type B, alors qu'en CP-MAS elle le serait par les carbonates labiles*) et que tous les carbones des carbonates de type B ne sont pas entièrement polarisés et cela quel que soit le temps de contact (*la largeur de la raie obtenue en SPE-MAS est plus faible que celle de la même raie obtenue en CP-MAS*). Cela résulterait des temps de relaxation spin réseau des protons dans le repère tournant (T_{1ρ}) plus courts que le temps de transfert de polarisation des ¹H de l'eau vers les ¹³C des carbonates de type B. les temps de transfert de polarisation dépendent de l'intensité des couplages dipolaires entre ces deux systèmes de spins et donc des distances qui les séparent.

Les spectres ^{31}P SPE-MAS des trois apatites (Figure II-12 (B)) sont relativement identiques et sont constitués d'une seule raie dissymétrique centré autour de 3,3 ppm et dont la largeur diminue lorsqu'on passe successivement de l'apatite maturée 1 jour (ANC-1j) aux apatites maturées 6 (ANC-6j) et 30 jours (ANC-30j). L'anisotropie de déplacement chimique étant totalement supprimée par la rotation de l'échantillon à l'angle magique (MAS), la dissymétrie de la raie s'expliquerait donc par l'existence de différents types de phosphores qui correspondraient essentiellement à ceux des groupements PO_4 et à ceux des ions HPO_4^{2-} . La diminution de la largeur de raie lorsqu'on passe de l'apatite maturée 1 jour aux apatites maturées 6 et 30 jours, signifierait donc une diminution de la teneur en ions HPO_4^{2-} avec la maturation, ce qui serait en parfait accord avec les résultats des mesures en ^1H SPE-MAS. Cependant étant donné la proportion relativement faible des ions HPO_4^{2-} par rapport à celle des ions phosphate qui dominant la raie, la réduction de largeur de raie résulterait davantage d'une meilleure cristallisation des apatites avec la maturation que de la diminution de la proportion des ions HPO_4^{2-} . La diminution de la proportion des ces derniers avec la maturation ne contribuerait que très faiblement à la diminution de largeur de raie.

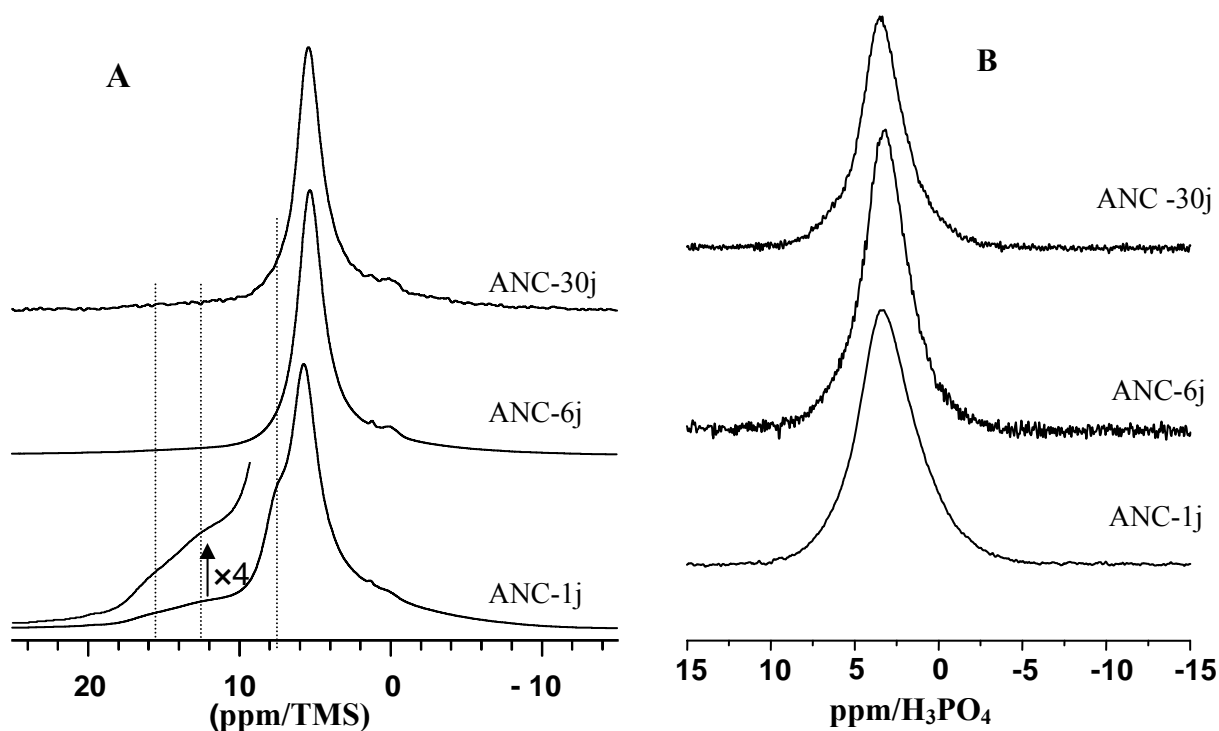


Figure II-12: Spectres ^1H SPE-MAS (A) et ^{31}P SPE-MAS (B) des apatites obtenues à différents temps de maturation.

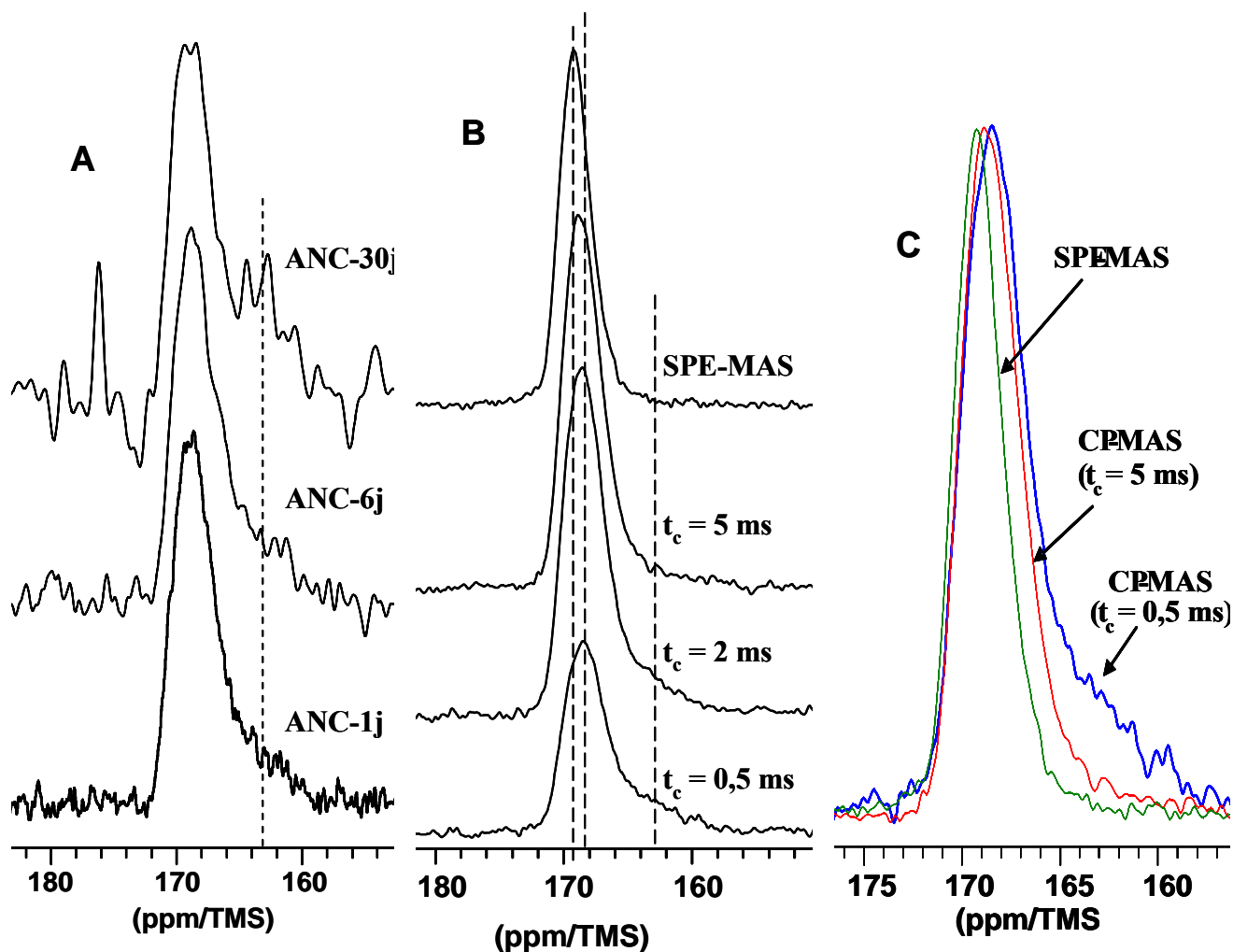


Figure II-13: Spectres $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CP-MAS obtenus à 2 ms dans les apatites mûrées à différentes durées (A) et à différents temps de contact dans l'apatite mûrée un jour (B). Ces derniers sont comparés au spectre obtenu par ^{13}C SPE-MAS sur le même échantillon enrichi en ^{13}C . Les spectres de la figure C correspondent à une extension d'échelle de certains spectres de la figure B.

III-2-5- Analyse chimique et surface spécifique

Les résultats des dosages du calcium, du phosphate, de carbonates ainsi que les mesures de surface spécifique effectuées sur les précipités sont rassemblés dans le tableau II-5. Les solides obtenus à différents temps de maturation présentent des rapports atomiques Ca/P et Ca/(P+C) faibles, caractéristiques d'apatites déficientes en calcium; cette observation corrobore la présence de bandes de vibrations relatives aux groupements carbonate et hydrogénophosphate dans les spectres infrarouge correspondant.

Au cours de la maturation, la quantité d'ions phosphate diminue tandis que les espèces carbonates ont tendance à s'incorporer dans la structure apatitique. Ceci atteste bien de la substitution des ions phosphate par les ions carbonate au sein du solide. Si on suppose que ce type de substitutions est très majoritaire, c'est le rapport Ca/(P+C) qui représente l'écart à la stœchiométrie et non plus le rapport Ca/P. Ce rapport varie très peu au cours du temps et reste proche de 1,39; ainsi, la maturation ne semble pas modifier dans ces conditions la stœchiométrie de ces apatites.

Il existe cependant une amélioration de la cristallinité observée par diffraction des rayons X qui correspond à la fois à un accroissement des dimensions des domaines apatitiques et une diminution du désordre cristallin (Cazalbou, 2002). Cet accroissement de la dimension cristalline a été attribué à une croissance des domaines apatitiques aux dépens de la couche de surface hydratée. Notons qu'il n'existe pas de relations entre la taille des domaines apatitiques déterminée par diffraction des rayons X et la mesure de la surface spécifique. En fait outre l'existence d'une couche hydratée de surface non-apatitique, inobservable par diffraction des rayons X, les nanocristaux ont la propriété de se lier et de fusionner, phénomène qui tend à diminuer la surface accessible des cristaux.

Tableau II-5 : Composition chimique (% massique \pm erreur relative) et surface spécifique des apatites ANC à différents temps de maturation.

Echantillon	Ca (%) ($\pm 0,5$ %)	P (%) ($\pm 0,5$ %)	CO ₃ (%) (± 1 %)	Ca/P (± 1 %)	Ca/(P+C) (± 2 %)	S _{BET} (m ² /g) (± 5 %)
ANC-1j	33,65	17,02	3,54	1,53	1,38	96
ANC-6j	33,81	16,47	4,50	1,59	1,39	201
ANC-30j	34,02	16,33	5,05	1,61	1,39	176
Os *	34,16	16,46	5,03	1,61	1,39	150-200
HA	37,20	17,57	-	1,64	-	59

* Kuhn et al., 2008

IV- PHOSPHATES OCTOCALCIQUES

IV-1- Synthèse

IV-1-1- Phosphate Octocalcique Apatitique (OCPa)

La méthode d'élaboration de l'OCPa consiste à précipiter le phosphate de calcium par double décomposition, à partir d'une solution de sel de calcium et d'une solution basique d'ions orthophosphate (Zahidi, 1984). Les solutions ont été préparées dans un milieu eau éthanol dans les proportions 50 %-50 % en volume; elles présentent les compositions suivantes avec un rapport atomique en solution $(Ca/P)_L$ égal à 1.

* Solution cationique: 7,09 g (0,03 mol) de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ sont dissous dans 100 ml d'eau permutée décarbonatée et 100 ml d'éthanol absolu (95%).

* Solution anionique: 3,96 g (0,03 mol) de $(NH_4)_2HPO_4$ sont dissous dans 250 ml d'eau permutée décarbonatée. A cette solution, sont ajoutés successivement 45 ml d'une solution d'ammoniaque à 20 % ($d = 0,92$) et 295 ml d'éthanol absolu (95 %).

IV-1-2- Phosphate Octocalcique Apatitique Carbonaté (OCPa-c)

Le protocole expérimental suivi pour la synthèse des échantillons d'OCPa-c est proche de celui adopté pour l'OCPa (Bennani, 1991). La précipitation a été effectuée à partir d'une solution contenant des ions calcium et une solution basique contenant des ions phosphate et carbonate dans un rapport atomique $CO_3/(CO_3+PO_4)_L$ égal à 40 %. Ce rapport permet l'obtention d'apatites contenant dans leur structure à la fois des ions hydrogénophosphate (HPO_4^{2-}) et carbonate (CO_3^{2-}). La composition des solutions réactant est la suivante:

* Solution cationique: 7,09 g (0,030 mol) de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ sont dissous dans 100 ml d'eau permutée décarbonatée et 100 ml d'éthanol absolu (95%).

* Solution anionique: 2,38 g (0,018 mol) de $(NH_4)_2HPO_4$ et 1,15g (0,012 mol) de $(NH_4)_2CO_3$ sont dissous dans 250 ml d'eau permutée décarbonatée. A cette solution, sont ajoutés successivement 45 ml d'une solution d'ammoniaque à 20 % ($d = 0,92$) et 295 ml d'éthanol absolu (95 %).

La précipitation des composés OCPa et OCPa-c a été effectuée à 37°C en versant rapidement, tout en agitant, la solution cationique dans la solution anionique. Les précipités formés ont été séparés des solutions mères par filtration sur büchner, puis lavés avec une solution basique constituée de 180 ml d'eau permutée décarbonatée, 30 ml d'une solution d'ammoniac ($d = 92$) et 210 ml d'éthanol absolu (95 %). La phase de filtration et de lavage dure environ 25 min. Le précipité est ensuite séché durant une nuit dans une étuve à 80°C.

IV-2- Caractérisation

IV-2-1- Diffraction des rayons X

Les diagrammes de diffractions des rayons X des échantillons préparés OCPa et OCPa-c sont représentés sur la figure II-14. On note la présence des raies caractéristiques d'une phase apatitique mal cristallisée. L'analyse des dimensions des cristallites (Tableau II-6) indique qu'elles sont de taille nanométrique. Il apparaît, dans ce cas que l'introduction des ions carbonate dans la structure apatitique inhibe la croissance des cristallites, et plus particulièrement dans la direction de l'axe c. Des observations similaires ont été rapportées par Bennani (1998).

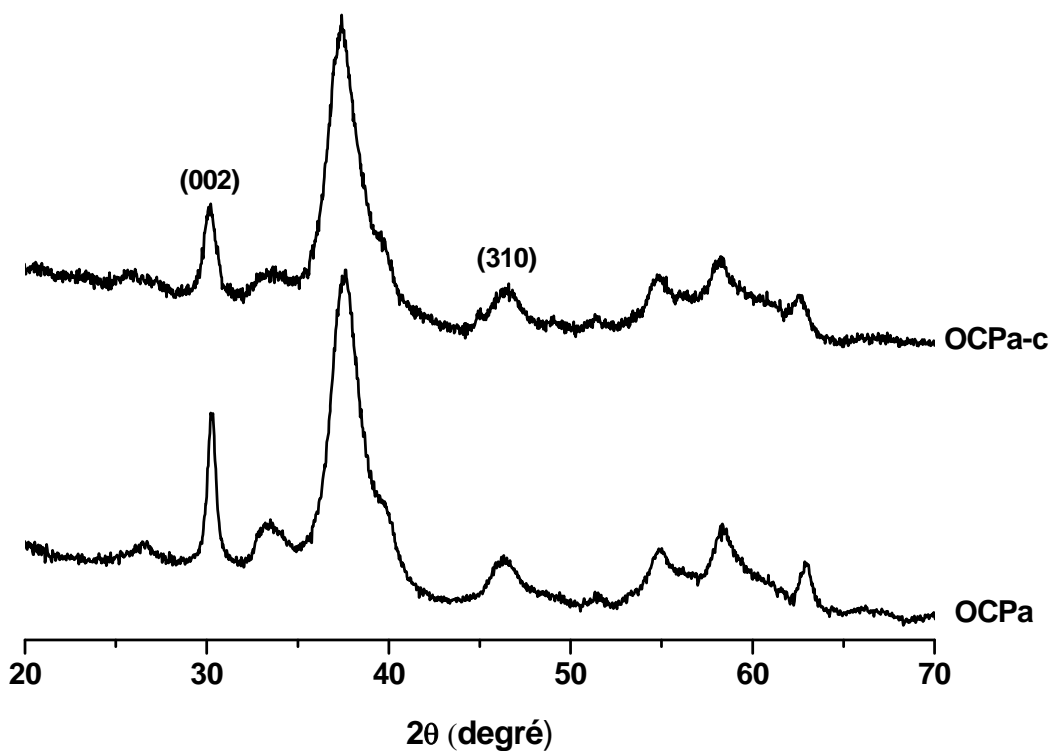


Figure II-14: Diagrammes de DRX de l'OCPa et l'OCPa-c

Tableau II-6: Dimensions apparentes des cristallites de l'OCPa et l'OCPa-c.

Echantillon	Dimensions apparentes des cristallites		
	$L_{(002)} (\pm 5 \text{ \AA})$	$L_{(310)} (\pm 5 \text{ \AA})$	$L_{(002)}/L_{(310)}$
OCPa	187	55	3,4
OCPa-c	122	44	2,8
Os*	213	68	3,1

* Hina, 1996

IV-2-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF)

Les spectres IR des solides préparés OCPa et OCPa-c sont représentés dans la figure II-15. On distingue dans les deux cas des bandes larges et mal résolues confirmant la faible cristallinité des solides, notée par DRX. Ces composés présentent les mêmes bandes phosphate à 571, 601, 962, 1033 et 1089 cm^{-1} , propres aux groupements PO_4^{3-} dans un environnement apatitique.

La décomposition dans le domaine $\nu_4 \text{PO}_4$ des échantillons examinés (OCPa et OCPa-c) permet d'identifier les bandes attribuables aux ions phosphate non-apatitiques appartenant à la couche hydratée de surface (Figure II-16). Pour les deux solides on note la présence de bandes situées vers 535 et 617 cm^{-1} spécifiques aux groupements HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} labiles. Le spectre du composé OCPa montre en outre une bande à 630 cm^{-1} attribuée aux ions OH^- de la structure apatitique.

Le spectre IR de l'OCPa-c fait apparaître dans le domaine spectral 1400-1500 cm^{-1} deux bandes vers 1420 et 1455 cm^{-1} relatives au mode de vibration ν_3 des groupements carbonate apatitiques situés en sites de type B (Vignoles, 1984). Il révèle, en outre, une bande vers 875 cm^{-1} qui peut être attribuée à la fois aux ions carbonate et hydrogénophosphate. Aucune bande de vibration des groupements hydroxyle n'a été observée. La décomposition de la bande d'absorption d'ions carbonate entre 850 et 900 cm^{-1} ($\nu_2 \text{CO}_3$) met en évidence, en plus des bandes de vibration associées aux ions carbonate labiles vers 860 cm^{-1} , la présence d'ions carbonate qui occupent les sites A et B (Figure II-17). Ces bandes apparaissent dans la plupart des apatites mixtes de type AB et dans la phase minérale de l'os et de l'émail (Rey et al., 1991b).

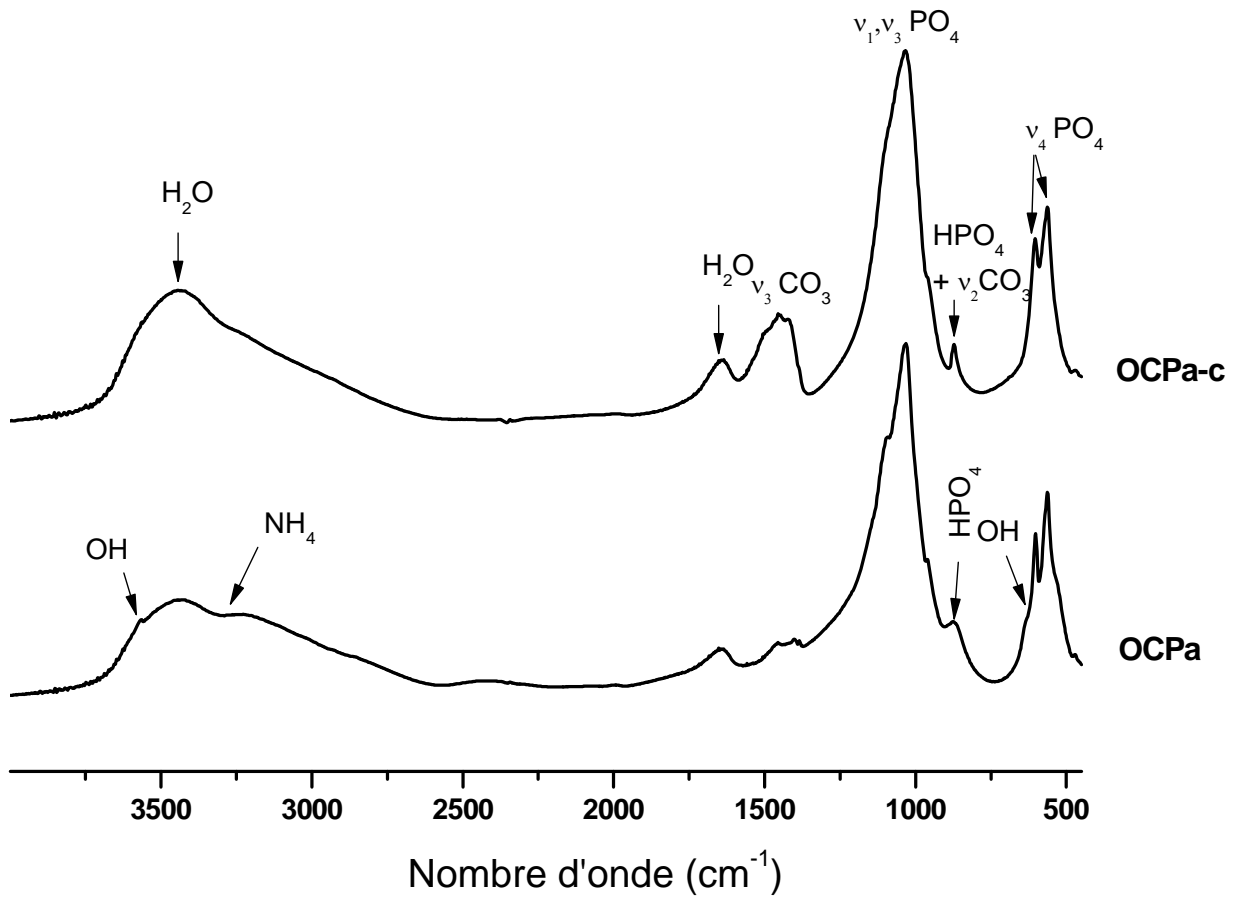


Figure II-15: Spectres IR de l'OCPa et l'OCPa-c

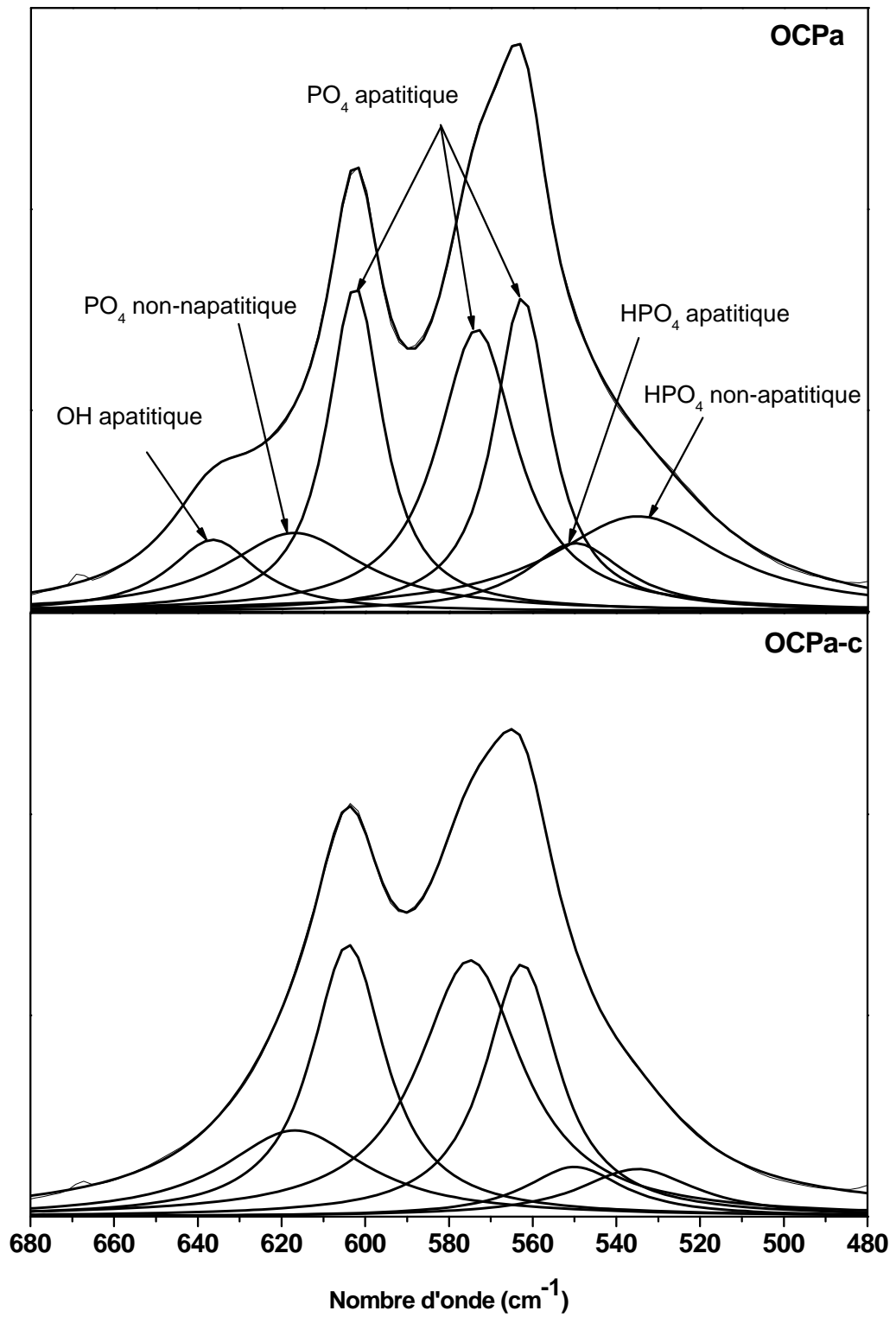


Figure II-16: Décomposition des bandes $\nu_4 \text{PO}_4$ (480-670 cm^{-1}).

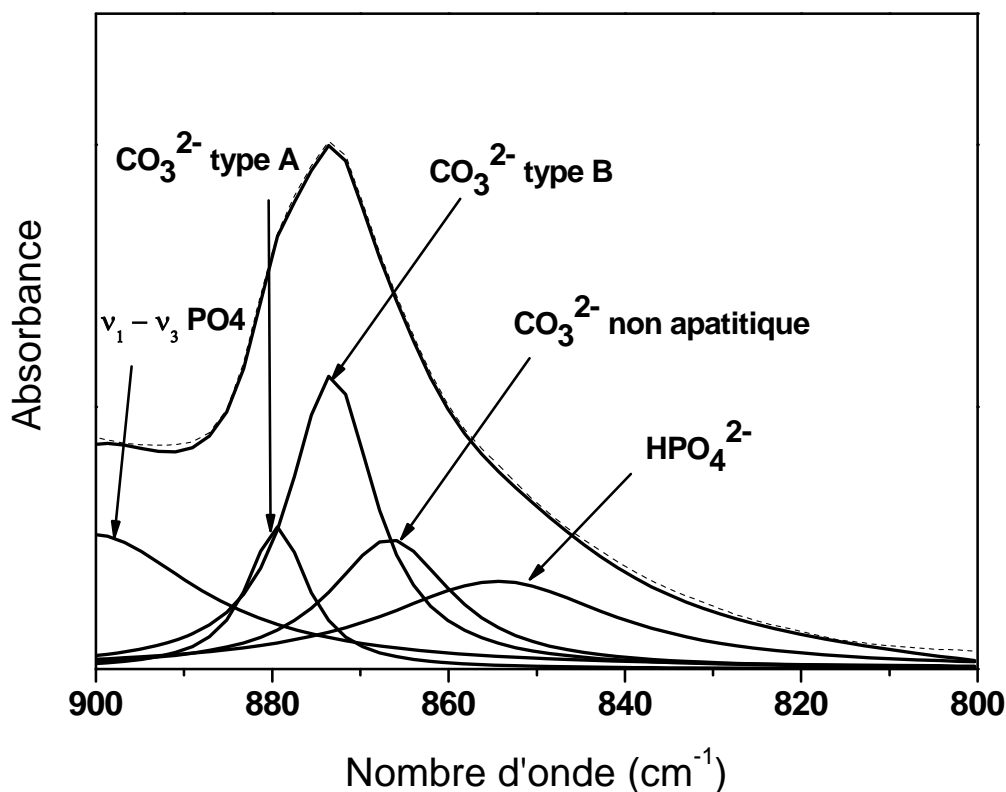


Figure II-17: Décomposition de la bande ν_2 CO_3 ($800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) de l'OCPa-c.

IV-2-3- Spectrométrie par diffusion Raman

Les spectres Raman des précipités OCPa et OCPa-c (Figure II-18) présentent les mêmes bandes de vibration des groupements phosphate notées dans l'apatite de basse cristallinité (tableau II-4) et sont analogues au minéral osseux. Cependant, des bandes de vibration caractéristiques d'ions OH^- apparaissent à 3570 cm^{-1} et 3573 cm^{-1} pour l'OCPa et l'OCPa-c, respectivement. La bande à 3573 cm^{-1} est généralement observée dans les apatites carbonatées de type B (Penel et al., 2003).

IV-2-4- Analyses chimiques et surface spécifique

Les résultats des analyses chimiques (calcium, phosphate, carbonates) ainsi que les mesures de surface spécifique effectuées sur les précipités sont reportés dans le tableau II-8. Le composé préparé en absence d'ions carbonate présente un rapport Ca/P de 1,33; le solide préparé en présence de carbonates quant à lui montre une valeur de 1,65. L'OCPa-c se caractérise par une grande surface spécifique ($90\text{ m}^2/\text{g}$), comparable à l'apatite carbonatée nanocristalline. La surface spécifique notée pour l'OCPa ($49\text{ m}^2/\text{g}$) reste très faible si on considère la taille des nanocristaux déterminées par DRX. Cela peut être probablement lié à l'agglomération des cristaux réduisant ainsi le nombre de sites d'adsorption accessibles aux molécules d'azote.

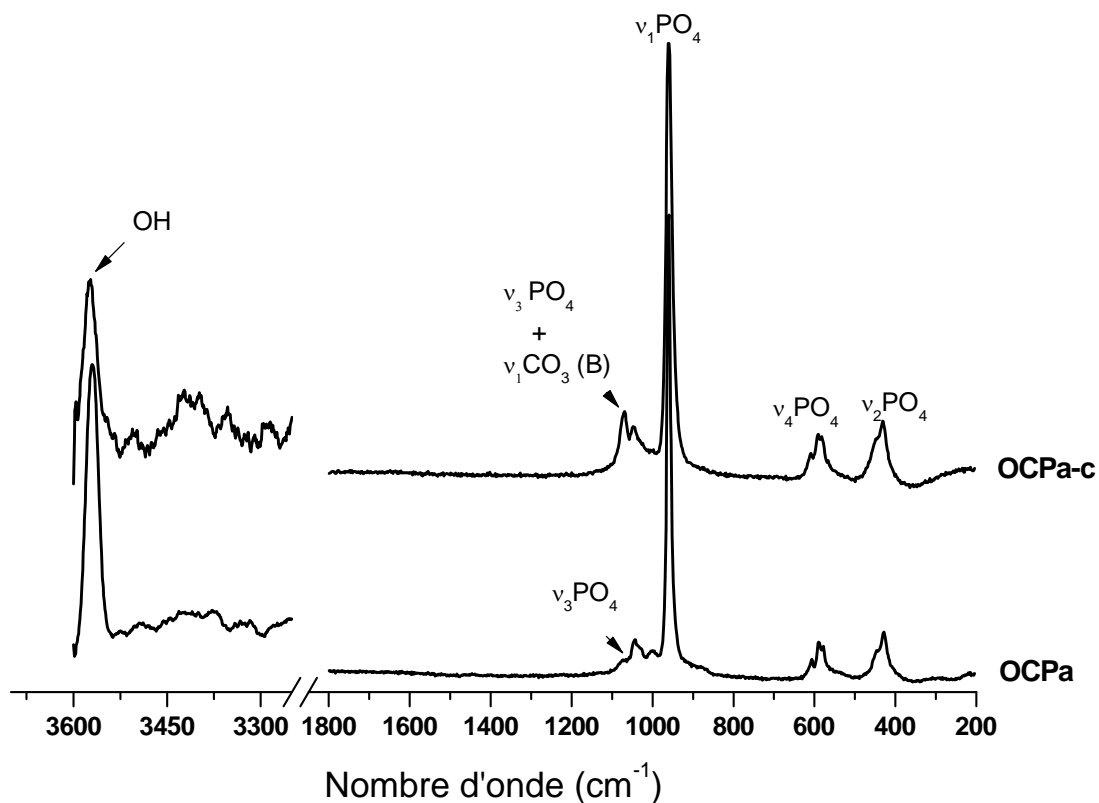


Figure II-18: Spectres de diffusion Raman de l'OCPa et l'OCPa-c

Tableau II-7: Composition chimique (% massique \pm erreur relative) et surface spécifique de l'OCPa et l'OCPa-c.

Echantillons	Ca (%) $\pm 0,5 \%$	P (%) $\pm 0,5 \%$	CO ₃ (%) $\pm 1\%$	Ca/P ($\pm 1\%$)	S _{BET} (m ² /g) ($\pm 5\%$)
OCPa	32,54	18,90	-	1,33	49
OCPa-c	32,31	15,24	5,52	1,65	90
ANC-1j	33,65	17,02	3,54	1,53	96
Os bovin	34,16	16,46	5,03	1,61	150-200
HA	37,20	17,57	-	1,64	59

V- CONCLUSION

Dans le cadre de ce travail nous avons élaboré et caractérisé des phosphates de calcium présentant différentes caractéristiques physicochimiques en vue d'examiner leurs propriétés d'adsorption.

L'hydroxyapatite préparée est une apatite bien cristallisée, minéralogiquement pure et sensiblement stœchiométrique. Elle est caractérisée par une surface spécifique de 59 m²/g et est constituée de cristallites de longueur moyenne proche de 57 nm.

Les solides synthétisés dans des conditions physiologiques de pH et de température sont des apatites nanocristallines carbonatées de type AB similaires au minéral osseux, et exempt de toute phase étrangère autre que l'apatite. Ces précipités se caractérisent par des surfaces spécifiques variant de 96 à 201 m²/g.

Le processus de maturation de ces apatites est fortement lié à l'existence d'une importante proportion d'environnements phosphate et carbonate non apatitiques labiles, localisés à la surface des cristallites. Ce processus est accompagné par un déplacement des ions CO₃ et HPO₄ labiles, durant la maturation de ces précipités, de la surface vers les sites apatitiques les plus stables. Ainsi, cette évolution est attestée par une augmentation à la fois de la taille apparente des cristallites et du rapport Ca/P de ces matériaux. Cela traduit une amélioration de la cristallinité des apatites étudiées.

Les phosphates octocalciques formés en milieu eau-éthanol sont similaires à une phase apatitique mal cristallisée; cependant les surfaces spécifiques de ces composés sont relativement faibles, comparées aux apatites nanocristallines (ANC).

Les divers phosphates de calcium ainsi préparés et caractérisés serviront de supports pour l'étude d'interaction vis-à-vis du risédronate, un bisphosphonate de troisième génération.

Partie B

Elaboration et caractérisation des sels de risédronate de calcium

I- INTRODUCTION

Les bisphosphonates sont des analogues synthétiques stables en milieu biologique des pyrophosphates (Fleisch et al., 1998), et se caractérisent par une structure de type P-C-P (liaison phosphore-carbone-phosphore) non présente naturellement dans l'organisme. Ils sont particulièrement indiqués dans le traitement préventif ou curatif de certaines affections du tissu osseux, notamment celles impliquant des désordres du remodelage (Russel et Rogers, 1999). Ainsi, ils inhibent la formation, l'agrégation, et ralentissent aussi la dissolution des cristaux de phosphate de calcium (Fleisch, 2002). Les chaînes latérales rattachées au carbone central sont responsables de l'affinité pour le tissu osseux et de l'effet biologique. Les bisphosphonates sont classés en « générations » selon leur pouvoir d'anti-résorption osseuse qui est fortement lié à la nature de la chaîne latérale R₂ sur l'atome de carbone (chapitre I, paragraphe II-2-2).

Le mécanisme d'action *in-vivo* des espèces bisphosphonate s'explique principalement par une forte capacité à s'adsorber sur le minéral osseux, dont ils diminuent la résorption en inhibant l'activité des ostéoclastes. Il s'agit donc à la fois d'un phénomène physico-chimique et biologique. L'étude des propriétés chélatantes des acides bisphosphoniques montre (Matczak-Jon et Videnova-Adrabinska, 2005) que ces espèces sont des ligands très efficaces de nombreux ions métalliques (Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ et Mg²⁺). Des études cristallographiques menées sur ces composés et sur leurs complexes métalliques ont mis en évidence que la nature de la chaîne hydrocarbonée substituée influence les propriétés chélatantes des bisphosphonates (Matczak et al., 2006); ceci se traduit par la modification de la flexibilité et des degrés d'ionisation de leur fonction hydroxybisphosphonique. Les bisphosphonates peuvent former *in-vivo* des complexes solubles et/ou insolubles avec les ions métalliques présents dans le plasma, en particulier le calcium et le magnésium (Matczak-jon et al., 2006). Les complexes solides formés, considérés comme phases étrangères, sont retenues et éliminées par l'organisme (mécanisme de phagocytose) via le système réticulo-endothélial¹ (Fleisch, 1993; Hirabayabayashi et al., 2002). La solubilité des bisphosphonates ainsi que les complexes solubles et/ou insolubles susceptibles de se former semblent être d'une grande importance dans le processus de fixation des

¹ Ensemble de cellules jouant un rôle d'épuration de l'organisme, notamment en absorbant les particules étrangères (phagocytose) et en participant aux réactions de défense immunitaire de l'organisme (Dictionnaire médical).

bisphosphonates par le minéral osseux (Hirabayachi et al., 2001). Ainsi, dans le but de mieux appréhender le processus d'interaction des bisphosphonates avec le minéral osseux et les phénomènes de rétention à long terme, l'étude systématique de l'aptitude de ces acides à former des sels et/ou des complexes avec le calcium s'avère indispensable.

Nous nous intéressons dans le cadre de cette partie de travail à l'étude des interactions entre le risédronate monosodique et le calcium en solution aqueuse. Après une introduction concernant le bisphosphonate utilisé comme adsorbat, nous présenterons la synthèse de différents sels de calcium/risédronate (Ca_xBP_y) ; pour cela diverses conditions expérimentales ont été adoptées (pH, rapport Ca/BP en solution). Les produits ainsi obtenus ont été caractérisés à l'aide de techniques physico-chimiques complémentaires (spectrophotométries IRTF et Raman, DRX, RMN du solide et MEB). Ensuite, une étude complexométrique par conductimétrie a été réalisée dans des conditions physiologiques (pH \sim 7,3 et T \sim 37°C) afin de confirmer la nature des interactions mises en jeu entre ions calcium et espèces risédronate.

II- PREPARATION DES SELS DE RISEDRONATE DE CALCIUM

II-1- Généralités sur le risédronate monosodique

II-1-1- Présentation

Le risédronate est un dérivé aminé à fort pouvoir d'antirésorption de la troisième génération des bisphosphonates; il est indiqué particulièrement dans les traitements préventifs et curatifs de la perte osseuse postménopausique précoce (Leung et al., 2004; Delmas, 2008; Watts, 2008).

L'échantillon de bisphosphonate utilisé pour nos tests expérimentaux est un risédronate monosodique sous forme héli-pentahydraté de grande pureté (99,99 %), fourni gracieusement par les laboratoires Procter & Gambles Pharmaceuticals. Ce principe actif rentre dans la composition de comprimés commercialisés sous le nom d'Actonel[®]. Ses caractéristiques sont les suivantes:

- Formule moléculaire : $C_7H_{10}NO_7P_2Na \cdot 2,5H_2O$
- Masse moléculaire : 350,1 g/mol
- Formule développée :

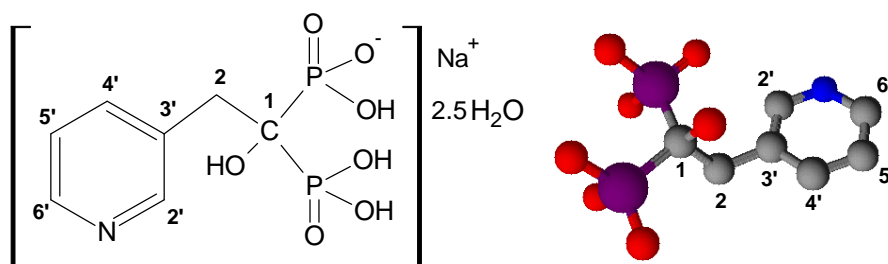


Figure II B-1: Sel monosodique [1-hydroxy-2-(3-pyridinyl)éthylidène]bis[acide phosphonique] héli-pentahydraté

Pour une simplification et commodité d'écriture, le bisphosphonate ou risédronate utilisé a été désigné dans la suite de ce travail par « BP ».

II-1-2- Analyses thermo-gravimétriques (ATD/ATG)

La courbe obtenue par analyses thermo-gravimétrique (ATG) et différentielle (ATD) sous air (Figure II B-2), confirme le taux d'hydratation donné par le fournisseur. On observe trois pertes de masse, entre 28 et 225°C, attribuables à l'élimination de l'eau d'hydratation. Ces pertes sont accompagnées de trois pics endothermiques vers 75, 145 et 195°C. Au delà de 225°C, la dégradation thermique des molécules de risédronate se manifeste par l'apparition d'un pic exothermique à environ 247°C (Redman-Furey et al., 2004).

La perte globale de masse observée entre 28 et 225°C est de 12,8 %, ce qui correspond à environ 2,5 moles d'eau par mole de risédronate monosodique.

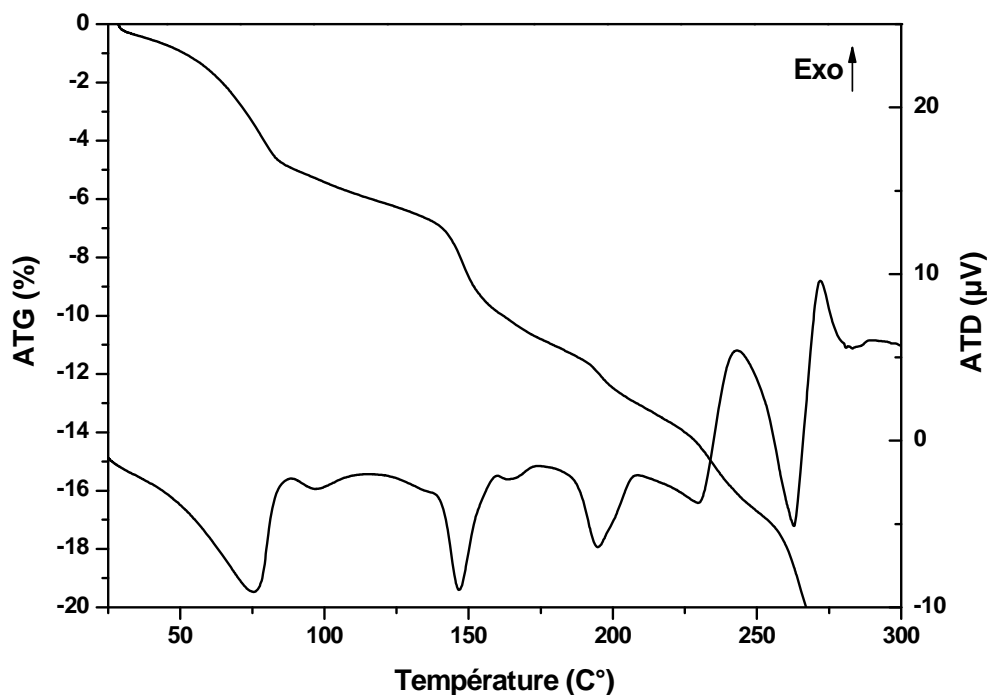


Figure II B-2: Courbe thermo-gravimétrique et différentielle (ATD/ATG) du risédronate de sodium.

II-1-3- Diagramme de spéciation

La figure II B-3 présente les différents équilibres de dissociation du risédronate monosodique. Le calcul des proportions des différentes formes ioniques de la molécule de risédronate a été réalisé sur la base des données de constantes d'acidité issues de la bibliographie (Nancollas et al., 2006; Takami et al., 2002; Hounslow et al., 2008). La figure II B-4 montre les différentes formes ioniques selon les conditions du pH du milieu.

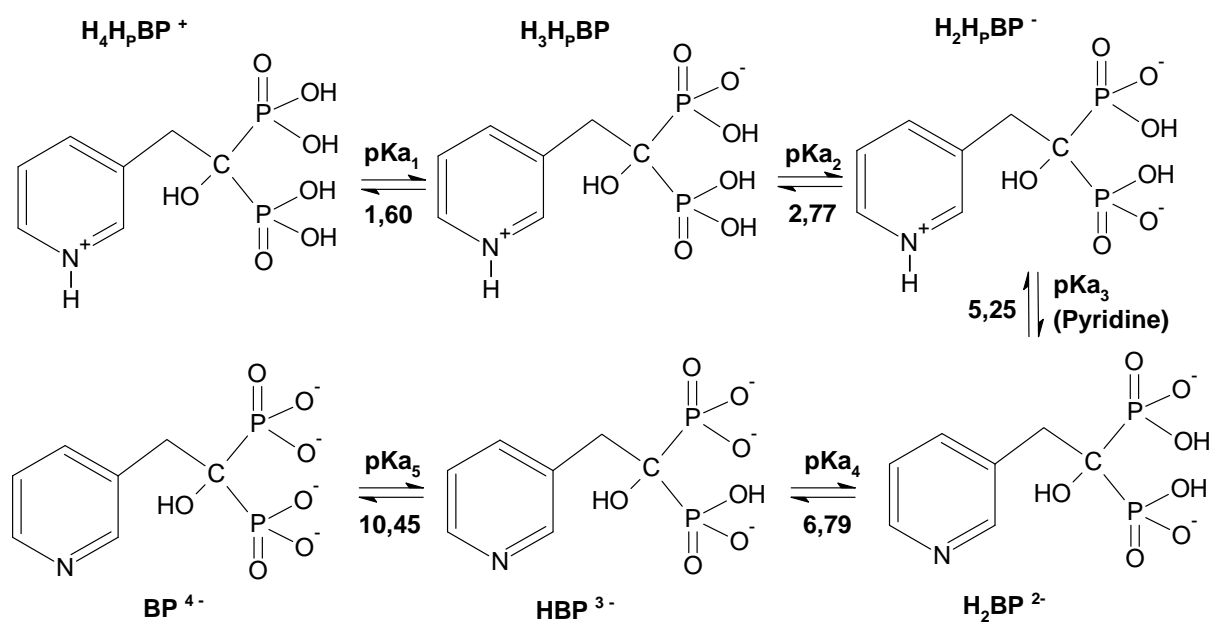


Figure II B-3: Equilibres de dissociation du risédronate monosodique (H_p désigne le proton porté par le groupement pyridine).

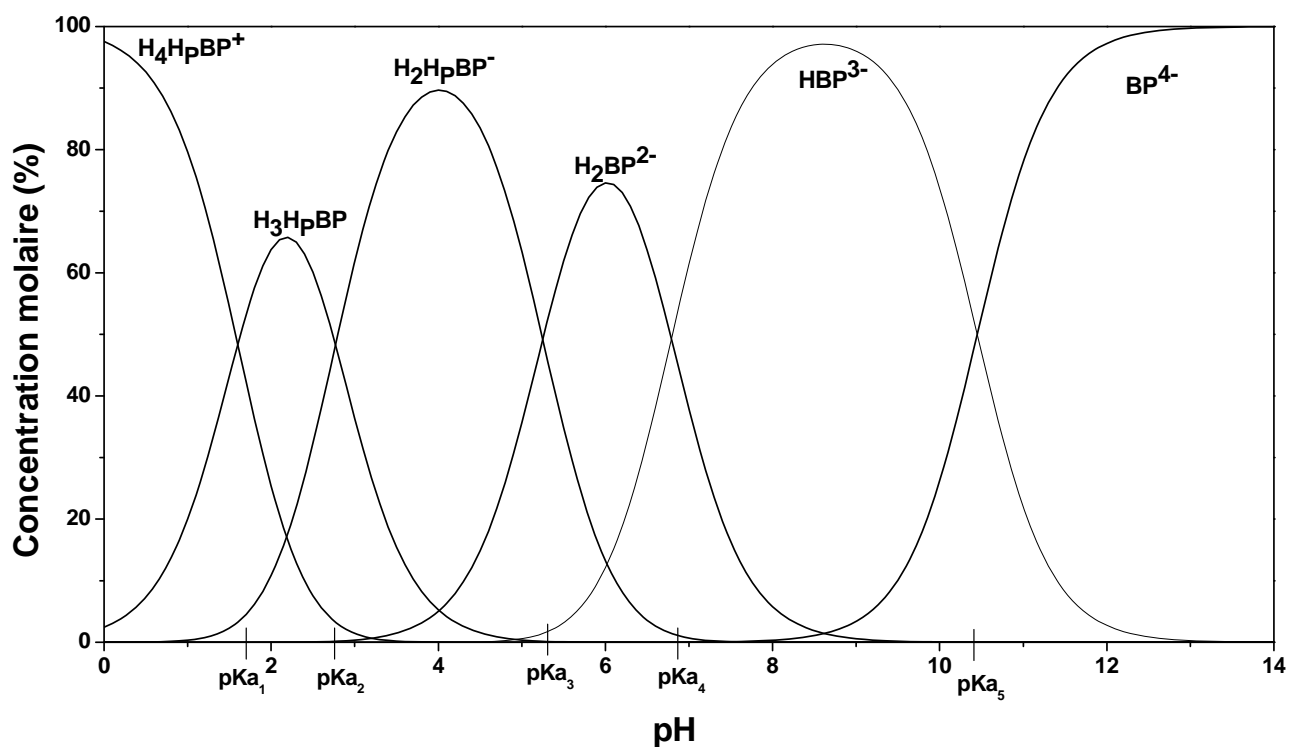


Fig II B-4: Diagramme de spéciation du risédronate monosodique.

II-1-4- Spectroscopie UV-Visible

La molécule de risédronate monosodique présente un maximum d'absorption ($\lambda_{\max} = 262 \text{ nm}$) dans le domaine UV-Visible (Figure II B-5). Cette Longueur d'onde correspond au maximum d'absorbance du groupement aromatique (pyridine) présent dans la molécule. Aucune variation du maximum d'absorption n'a été observée dans les conditions expérimentales étudiées (T, pH, ajout de chlorure de potassium, ajout de sels de phosphate et de calcium...). La concentration en risédronate est déterminée en utilisant la loi de Beer-Lambert. Pour chaque expérience réalisée dans ce travail une droite d'étalonnage a été effectuée dans la gamme de concentration explorée (0,1 à 0,3 mM). Le coefficient d'extinction molaire du risédronate (ϵ) déterminé à partir de l'ensemble des droites obtenues est de $3,77.10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, valeur similaire à celle rapportée ($3,90.10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) dans la littérature (Vallano et al., 2003).

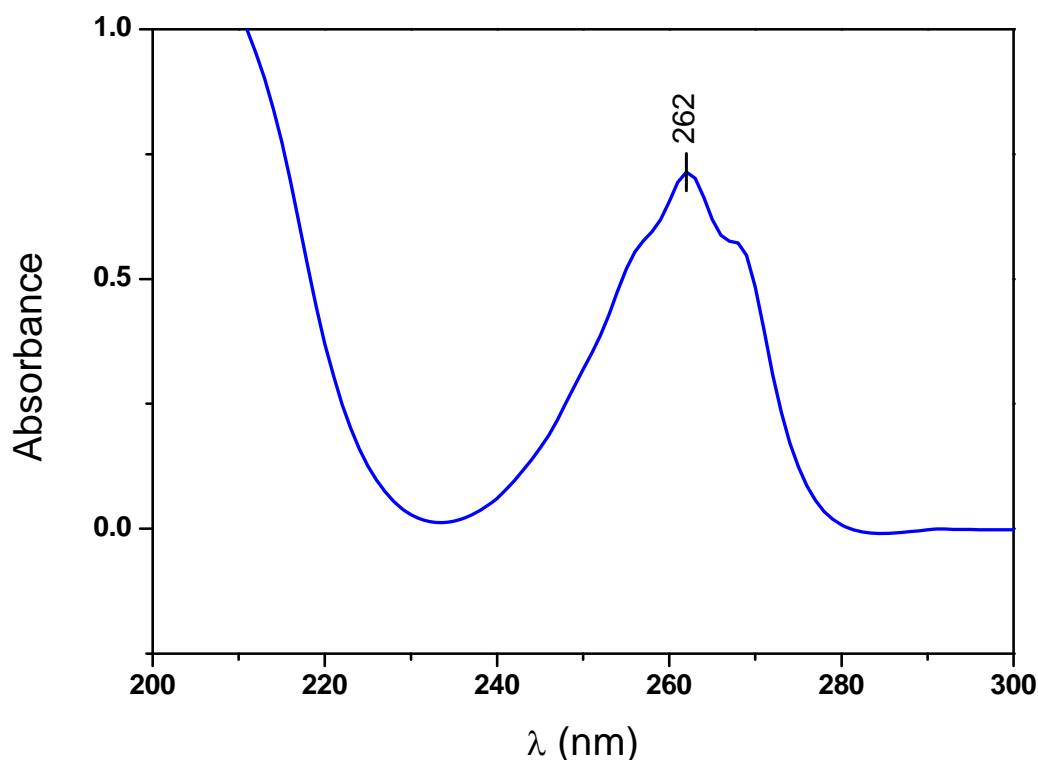


Figure II B-5: Spectre UV-Visible du risédronate monosodique 0,2 mM dans un milieu KCl 1mM à pH 7,4 et 25°C.

II-2- Synthèse et caractérisation de sels de risédronate de calcium

II-2-1- Synthèse

Afin de préciser les caractéristiques physico-chimiques des composés que le risédronate pourrait former en présence du calcium (Ca_xBP_y), nous avons procédé à la synthèse et la caractérisation des sels du risédronate de calcium. La préparation de ces composés a été réalisée par co-précipitation entre une solution de nitrate de calcium et une solution de risédronate dans différentes conditions expérimentales (concentrations des espèces, pH et rapport molaire $(\text{Ca}/\text{BP})_L$ en solution).

La solution de nitrate de calcium a été ajoutée goutte à goutte, à température ambiante, à la solution de risédronate maintenue sous agitation et dont le pH a été initialement ajusté à la valeur désirée par ajout d'une solution d'ammoniaque (65 %).

Le précipité formé est laissé mûrir pendant un jour, puis filtré sur millipore (0,45 μm) et lavé abondamment par de l'eau permutée décarbonatée. Il est ensuite séché à l'étuve (37°C) pendant 20 heures.

Ainsi nous avons préparé 3 sels de risédronate de calcium (Ca_xBP_y) que nous noterons Ca_2BP , CaBP(A) et CaBP(B) , selon les conditions expérimentales et la composition des solutions :

Sel Ca_2BP :

- Solution de calcium : 520 mg de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 10 ml d'eau décarbonatée (0,22 M).

- Solution de risédronate : 350 mg de risédronate sont dissous dans 25 ml d'eau décarbonatée (0,04 M). Le pH de la solution a été ensuite ajusté à une valeur voisine de 10. La valeur du pH de fin de réaction est proche de 9,7.

- Rapport en solution $(\text{Ca}/\text{BP})_L \sim 2$

Sel CaBP(A) :

- Solution de calcium : 265 mg de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 10 ml d'eau décarbonatée (0,11 M).

- Solution de risédronate : 350,1 mg de risédronate sont dissous dans 25 ml d'eau décarbonatée (0,04 M) puis le pH a été ajusté à une valeur voisine de 8. A la fin de la réaction le pH est proche de 6,8.

- Rapport en solution $(\text{Ca}/\text{BP})_L \sim 1,1$

Sel CaBP(B) :

- Solution de calcium : 75,71 mg de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 10 ml d'eau décarbonatée (0,32 M).

- Solution de risédronate : 100 mg de risédronate sont dissous dans 25 ml d'eau décarbonatée (0,04 M). Le pH de cette solution a été ajusté à une valeur voisine de 11. La valeur du pH de fin de réaction est proche de 9,30.

- Rapport en solution $(\text{Ca}/\text{BP})_L \sim 1,1$

II-2-2- Caractérisation

II-2-2-1 Diffraction des rayons X

Le diagramme de diffraction des rayons X du risédronate monosodique hémipentahydrate (BP) est celui d'un solide cristallin (Figure II B-6). La structure cristalline de ce bisphosphonate est bien connue (Redman-Furey, 2004): il cristallise dans le système monoclinique ($a = 21,7463\text{\AA}$, $b = 8,9667\text{\AA}$; $c = 15,1193\text{\AA}$; $Z=8$; groupe d'espace $C2/c$).

Un premier examen des diagrammes fournis par les sels de risédronate de calcium synthétisés montre trois composés différents. Le sel Ca_2BP présente des raies larges et mal résolues, caractéristiques d'un solide amorphe. Cependant, les sels CaBP(A) et CaBP(B) montrent des raies fines et bien résolues, spécifiques aux solides cristallins. Toutefois, le sel CaBP(A) obtenu à pH neutre et à forte concentration est mieux cristallisé que CaBP(B) préparé à pH basique et à plus faible concentration. Ainsi pour un même rapport molaire initial en solution de $(\text{Ca}/\text{BP} \sim 1)$, les solides obtenus sont cristallins mais de structure dépendante du pH. Le pH est donc un facteur déterminant dans la formation de ces sels. A notre connaissance, les sels de risédronate de calcium de type CaBP et Ca_2BP n'ont pas été décrits auparavant dans la littérature.

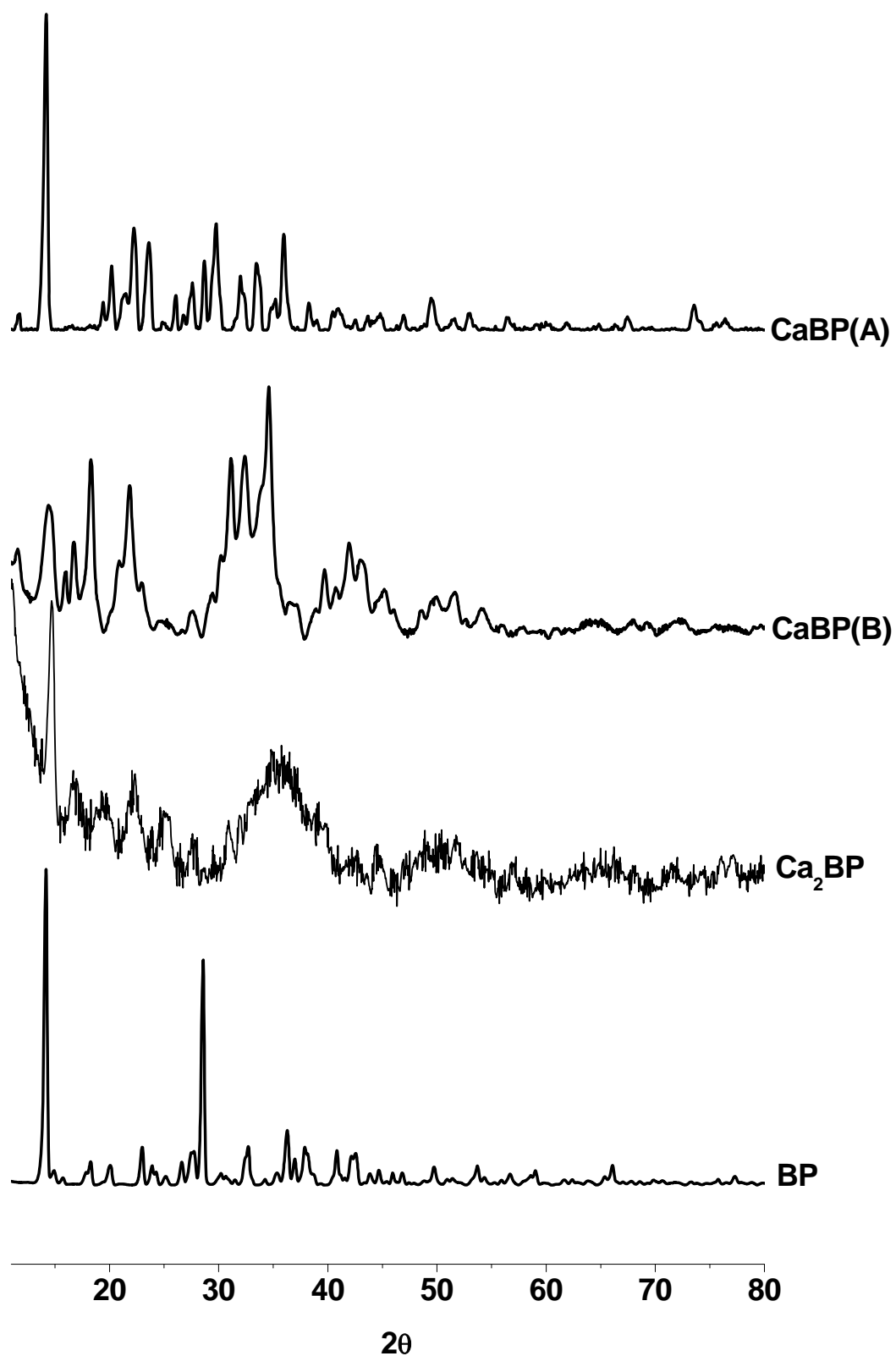


Figure II B-6: Diagramme de DRX des sels de risédronate de calcium préparés et du risédronate monosodique (BP).

II-2-2-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF)

Le spectre infrarouge réalisé sur l'échantillon de risédronate monosodique (Figure II B-7) est comparable à ceux des sels de sodium semi-pentahydratés du risédronate (Redman-Flurey et al., 2004). Il indique la présence de deux bandes de faible intensité vers 3557 et 3614 cm^{-1} caractéristiques de deux environnements différents des molécules d'eau dans la structure cristalline du risédronate de sodium. La bande large centrée vers 3366 cm^{-1} est attribuée à des groupements OH^- impliqués dans les liaisons hydrogène. L'épaule observée vers 3333 cm^{-1} est associée aux groupes hydroxyles OH attachés au carbone central du risédronate (C-OH). La région spectrale située entre 900 et 1200 cm^{-1} est dominée par des bandes intenses caractéristiques d'acides phosphoniques, superposées à celles de la fonction pyridine. Les bandes attribuées aux modes de vibrations symétrique et asymétrique des groupements phosphonates (PO_3) apparaissent dans la région 1000 – 1150 cm^{-1} . La vibration des liaisons P-OH est observée vers 935 cm^{-1} . Le spectre montre également des bandes larges situées entre 1600 et 2700 cm^{-1} , attribuées aux ions OH^- associés aux groupements O=P-OH (Redman-Flurey et al., 2004). Les bandes de vibration caractéristiques de liaisons P-C sont situées entre 650 et 795 cm^{-1} (Socrates, 2004).

Un premier examen des spectres obtenus pour les sels de calcium synthétisés (Figure II B-7) montre qu'ils présentent des bandes de vibration similaires dans la région caractéristique des groupements phosphonates (PO_3) et des fonctions pyridine. La bande de l'eau dans ces composés est plus intense que celle du sel de sodium. Il paraît difficile de différencier entre les sels de calcium précipités du fait qu'aucun déplacement significatif de bandes n'est observé. Cependant, les spectres des sels désignés CaBP(A) et CaBP(B) présentent d'une manière générale des bandes plus fines et mieux résolues comparées à celles du précipité Ca_2BP , notamment dans la région spectrale spécifique aux modes de vibrations des groupements PO_3 où un dédoublement est observé. Ces observations sont en accord avec l'état cristallin des précipités révélés par la diffraction des rayons X.

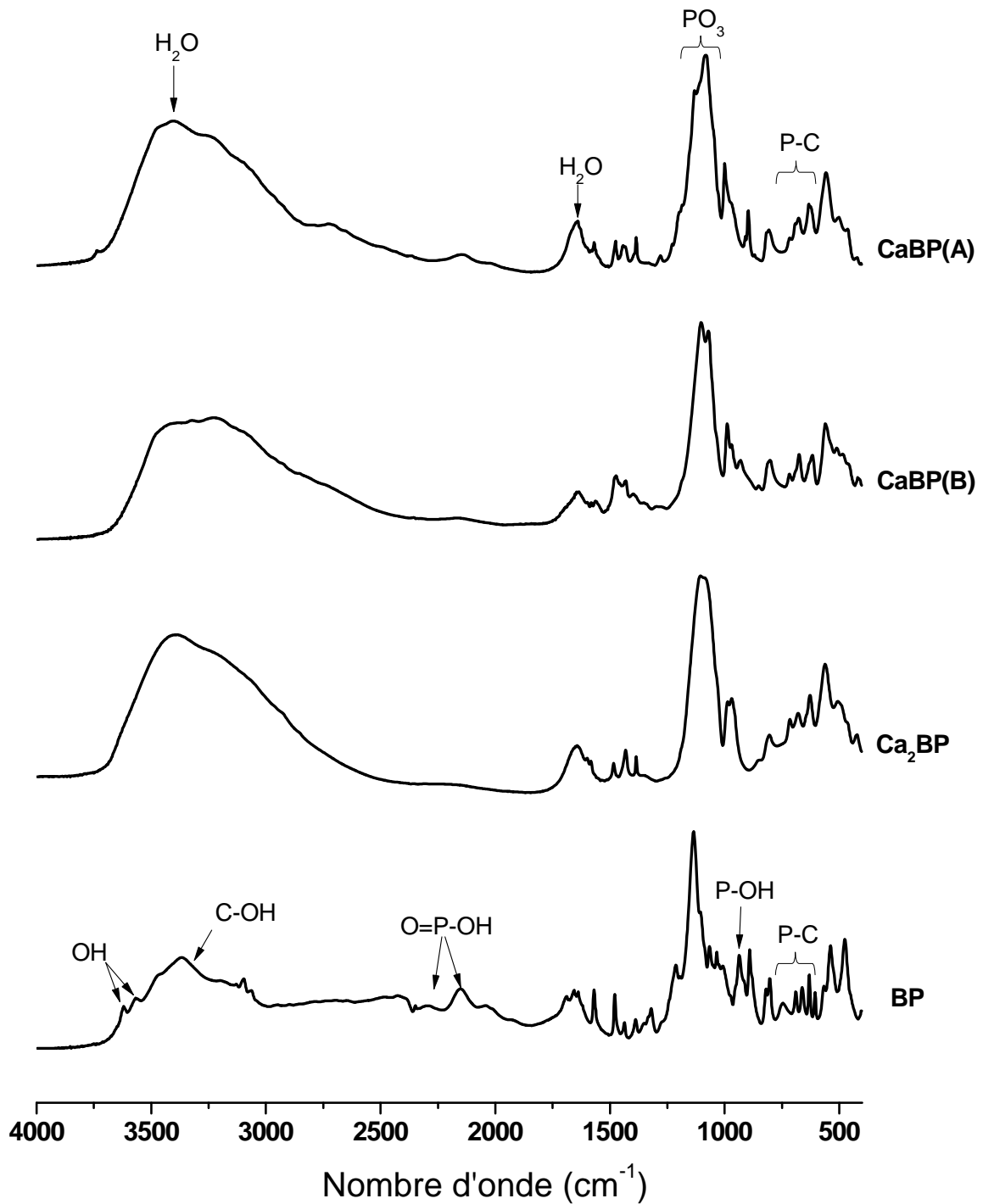


Figure II B-7: Spectres IR des sels de risédronate de calcium synthésisés et du risédronate monosodique (BP).

II-2-2-3- Spectrométrie par diffusion Raman

La spectrométrie Raman est complémentaire à la spectrométrie IR et est plus sensible aux modes de vibrations du groupement pyridine présent dans le bisphosphonate étudié. La figure II B-8 montre les spectres Raman du risédronate de sodium et des précipités synthétisés. Les différentes bandes de vibration observées pour ces composés et les attributions correspondantes sont regroupées dans le tableau II B-1. Il apparaît clairement que l'interaction du risédronate avec les ions calcium dans les sels préparés se traduit par le déplacement de bandes caractéristiques des divers groupements par rapport à celles du sel de sodium. Afin de mettre en évidence les différences ainsi notées, plusieurs domaines de vibration ont été examinés:

- Domaine de vibration $575 - 775 \text{ cm}^{-1}$ (Figure II B-8, b): cette région spectrale est caractéristique du domaine de vibration des liaisons C-P. Les deux bandes intenses qui apparaissent vers 629 et 661 cm^{-1} sur le spectre du sel de sodium (BP) sont déplacées vers les nombres d'ondes élevés (respectivement 642 et 677 cm^{-1}) dans le cas du Ca_2BP et sont dédoublées pour le solide CaBP(A). Pour le solide CaBP(B), seule la bande vers 642 cm^{-1} est dédoublée. Ces déplacements de fréquence traduisent l'existence de fortes interactions entre les molécules de risédronate et les ions calcium.

- Domaine de vibration $800 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ (Figure II B-8, c): pour le risédronate seul, on note des bandes intenses vers 1024 et 1054 cm^{-1} attribuées aux modes de déformation des liaison C - H du groupement pyridine (Redeman-Fuery et al., 2005); ces bandes sont déplacées sur les spectres des sels de calcium préparés respectivement vers 1035 et 1050 cm^{-1} .

- Domaine de vibration $1500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ (Figure II B-8, d): ce domaine spectral est sensible aux liaisons hydrogène créées par les molécules d'eau (Redeman-Fuery et al., 2005). Le spectre du sel de sodium (BP) montre une bande intense vers 1638 cm^{-1} avec un épaulement vers 1626 cm^{-1} ainsi qu'un pic moins intense à 1570 cm^{-1} , assignés aux vibrations du groupement pyridine. Dans les solides préparés, la bande intense et l'épaulement sont toujours présents mais sont déplacés respectivement vers 1595 cm^{-1} et 1581 cm^{-1} , tandis que le pic vers 1570 cm^{-1} figure seulement dans le composé CaBP(A). Les spectres des précipités CaBP montrent en outre une bande vers 1635 cm^{-1} , dédoublée pour le composé A et non dédoublée pour B. Ce domaine de vibration permet donc de différencier entre la forme libre et les différents sels du risédronate de calcium.

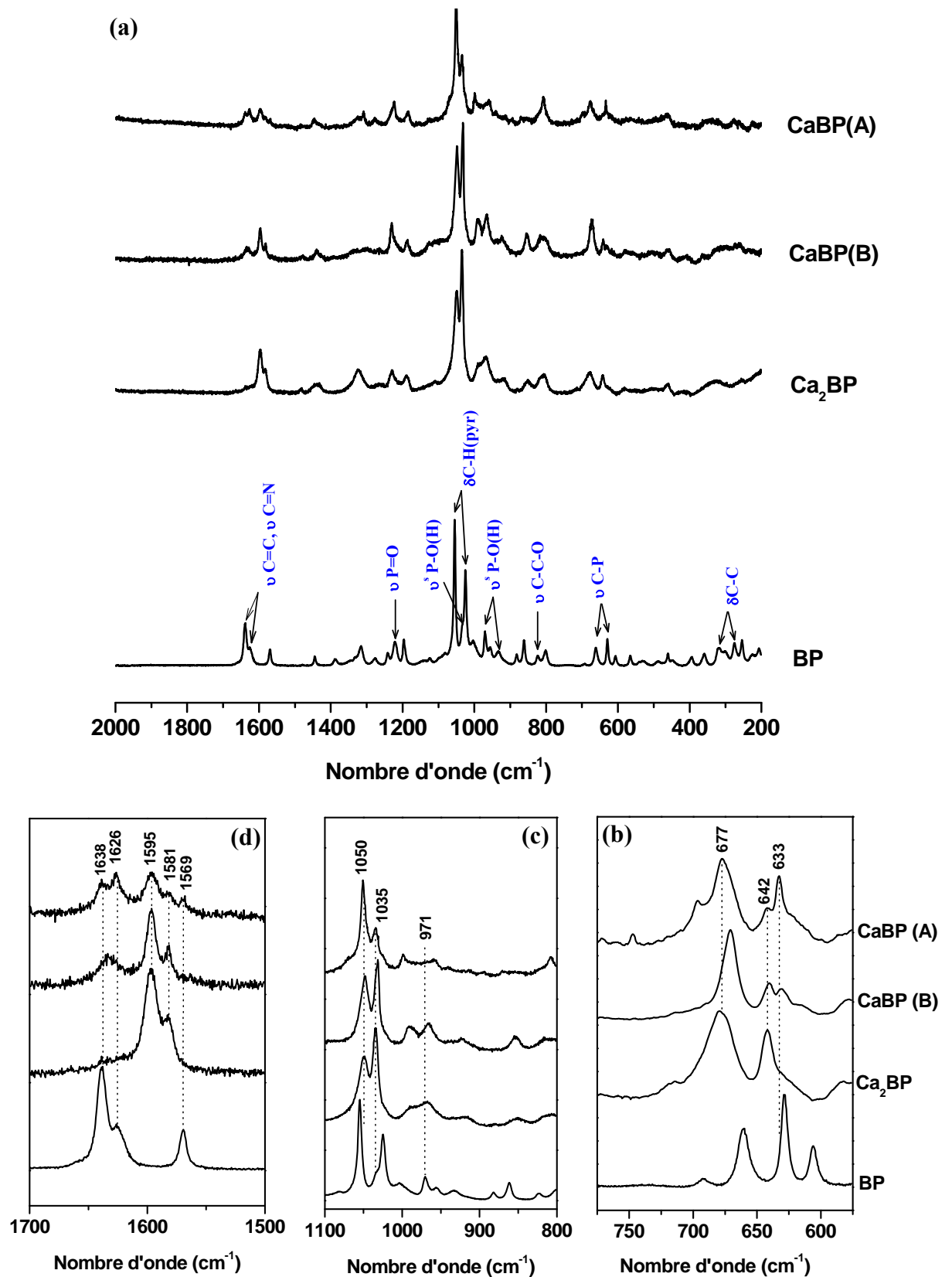


Figure II B-8: Spectres de diffusion Raman du risédronate de sodium (BP) et des sels de calcium élaborés dans différents domaines de vibration : (a) domaine 200 - 2000 cm^{-1} ; (b) domaine 575 - 775 cm^{-1} ; (c) domaine 800 - 1100 cm^{-1} ; (d) domaine 1500 - 1700 cm^{-1} .

Tableau II B-1: Attributions de principales bandes de vibrations observées dans les spectres Raman du risédronate monosodique et des précipités.

Attributions	Risédrionate ^{a,b}	Ca ₂ BP	CaBP(A)	CaBP(B)
δ C–C	276 m	-	-	-
	320 f	324 fl	-	-
ν C–P	629 m	642 m, l	642 f 633 f	642 tf 633 m
	661 m	677 m, l	677 m	673 m
ν C–C–O	823 f	807 m, l	807 m,l	807 m
δ (P-OH)	862 m	849 f	855 m	-
ν_s P–O(H)	932 f	914 f, l	923 f	-
	970 m	967 m, l	965 m	959 f,l
	1033 ép	-	-	-
δ (C–H) pyridine	1024 F	1034 tF	1031 tF	1033 F
	1054 F	1048 F	1048 tF	1050 tF
ν P=O/ δ^{II} POH	1222 p	1229 m	1229 m	1223 m
δ (C-H) pyridine	1315 m	1325 ml	-	1323 ép
ν (C=N), ν (C=C) pyridine	1445 f	1439 fl	1439 fl	1445 fl
	1569 m	-	-	-
	1625 tf	1582 tf	1581 tf	1581 tf
	1637 F	1596 F	1596 F	1596 m

p: petite ; **m:** moyenne; **ml:** moyenne et large; **F:** forte; **tF** : très forte ;

f : faible ; **tf** : très faible ; **ép:** épaulement

a: CuKrowski et al 2007 ; **b:** Socrates, 2004

II-2-2-4- Spectroscopie RMN de l'état solide

Les expériences menées par RMN ^{31}P du solide sur le risédronate monosodique et les sels de calcium permettent de clarifier l'environnement local des noyaux de phosphore. Pour cela deux types de mesures RMN ont été réalisés sur les poudres, à savoir des séquences HPDEC $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$ (Découplage dipolaire et scalaire à haute puissance du proton) et polarisation croisée à l'angle magique de rotation (^1H - ^{31}P CP MAS). Rappelons que dans le cas de la technique HPDEC, il s'agit d'une polarisation directe des noyaux de phosphore sans passer par le proton; la polarisation croisée quant à elle consiste en un transfert d'aimantation du proton vers le phosphore, ce qui permet de réduire les temps d'acquisition et d'augmenter la sensibilité en exaltant la contribution des noyaux de phosphore à proximité immédiate de protons.

En fait, si on considère les spectres obtenus, les deux méthodes donnent la même résolution et des déplacements chimiques du même ordre. Pour cette raison, seuls les spectres obtenus par polarisation croisée (^1H - ^{31}P CP MAS) sont présentés.

Le spectre du risédronate de sodium (Figure II B-9) montre deux pics vers 19,01 ppm et 17,12 ppm, qui indiquent deux environnements différents du ^{31}P dans la structure. En effet les deux groupements phosphonate ne sont pas chimiquement équivalents dans la molécule et, par ailleurs, l'ion sodium et les molécules d'eau n'interagissent pas de façon identique avec ces deux groupements, en accord avec les déterminations structurales de Redman-Flurey et al. (2005).

Dans le cas du précipité Ca_2BP , les deux pics caractéristiques du risédronate disparaissent et sont remplacés par un massif large centré à 18,14 ppm. Ce résultat confirme le changement significatif de l'environnement des noyaux du phosphore suite à l'interaction avec le calcium. L'allure du massif est en accord avec l'état amorphe de ce composé révélé par la DRX.

Dans le cas des solides CaBP(A) et CaBP(B) préparés dans un rapport Ca/BP de 1, les spectres RMN $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP MAS présentent différents pics avec des positions variables, qui pourraient être attribués aux différences d'environnement des noyaux de phosphore et du taux d'hydratation. Pour le composé CaBP(B) , on note la présence de deux pics larges vers 16 et 19 ppm ainsi qu'un épaulement à 13,5 ppm. Ces pics sont déplacés par rapport au sel de sodium, et les deux groupements phosphonate là encore possèdent deux environnements chimiques différents. Pour le composé CaBP(A) , le spectre présente 2 raies fines à 11,84 et 19,47 ppm et un épaulement vers 22,19 ppm. Ces observations attestent de l'état bien cristallisé du composé, en accord avec le diagramme DRX. Ces trois raies apparaissent sur une bande large centrée vers 19 ppm ressemblant à celle observée pour le solide Ca_2BP .

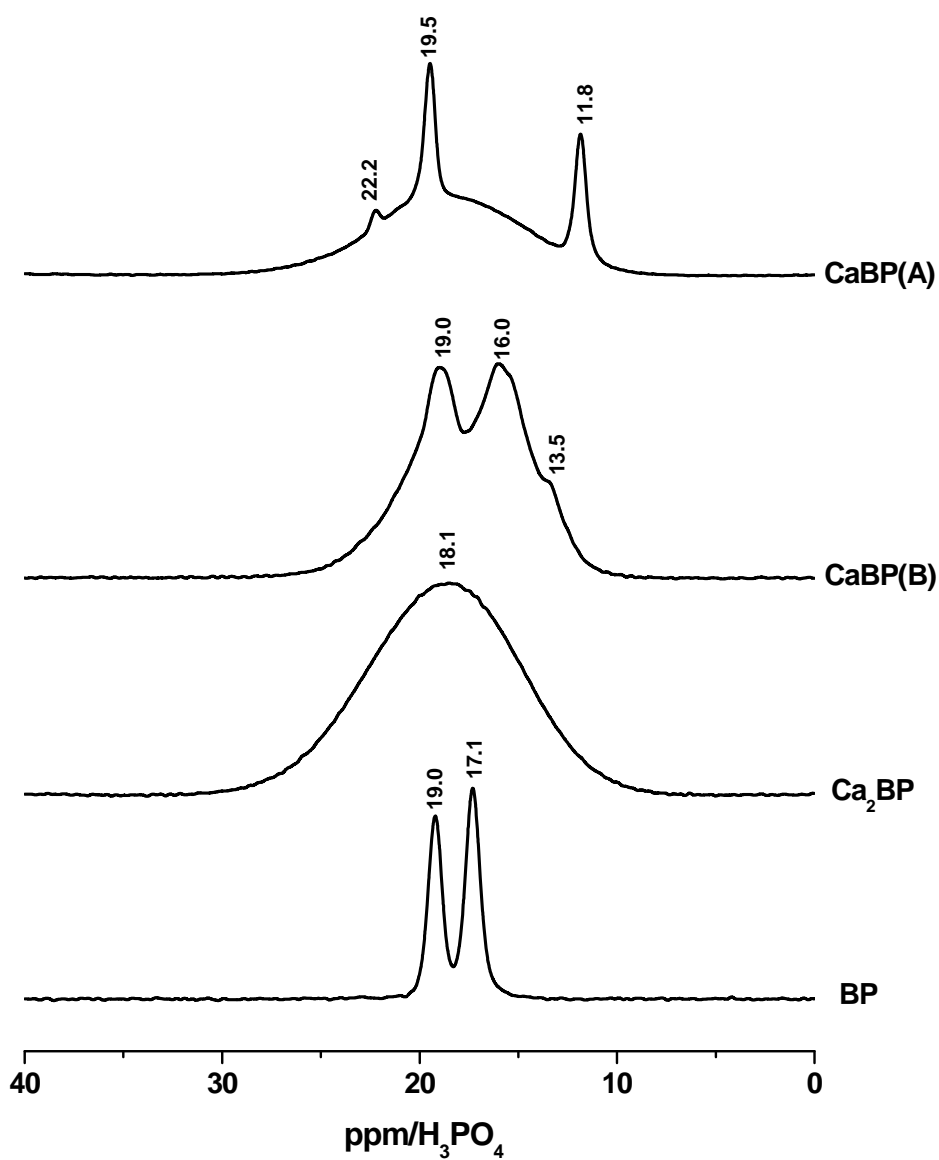


Figure II B-9: Spectres RMN $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP MAS du risédronate de sodium (BP) et des sels de risédronate de calcium élaborés.

II-2-2-5- Microscopie électronique à balayage (MEB)

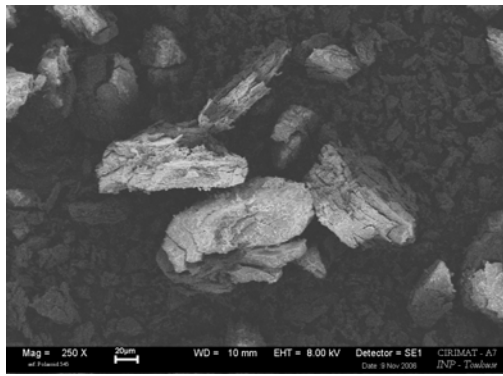
Les observations par MEB du risédronate de sodium montrent des blocs de plusieurs dizaines de μm de longueur, lesquels sont formés de lamelles accolées d'épaisseur proche du μm (Figure II B-10). Les photos MEB du précipité Ca_2BP montrent des blocs de forme anguleuse de taille hétérogène allant jusqu'à plusieurs dizaines de μm de longueur. Dans le cas de CaBP(A) et CaBP(B) on note la présence de petits cristaux de longueur avoisinant le μm , attestant d'une cristallinité meilleure de ces précipités, en accord avec les résultats obtenus par DRX.

II-2-2-6- Analyses chimiques

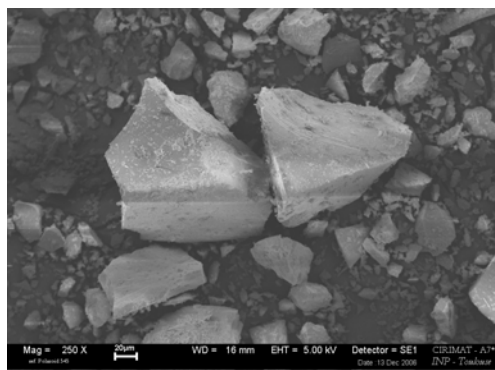
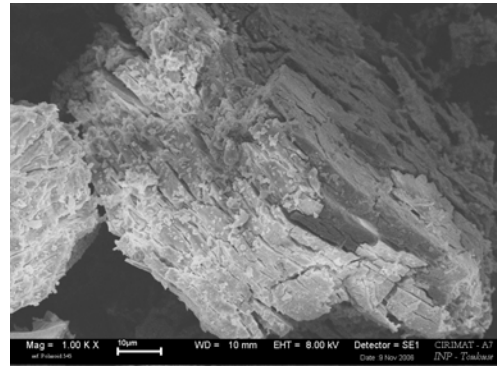
Les dosages du calcium et du risédronate ont été réalisés après solubilisation des précipités dans de l'acide nitrique (3N), respectivement par volumétrie en retour après complexation par l'EDTA et par spectroscopie UV-Visible. Les résultats obtenus (Tableau II B-2) indiquent que le solide Ca_2BP présente un rapport molaire ($\text{Ca/BP} = 1,94$) proche de 2; pour les solides CaBP(A) et CaBP(B) préparés dans un rapport Ca/BP en solution de 1, les rapports molaires sont de 0,89 et 1,23, respectivement.

Tableau II B-2: Composition chimique (% massique \pm erreur relative) des sels de risédronate de calcium préparés.

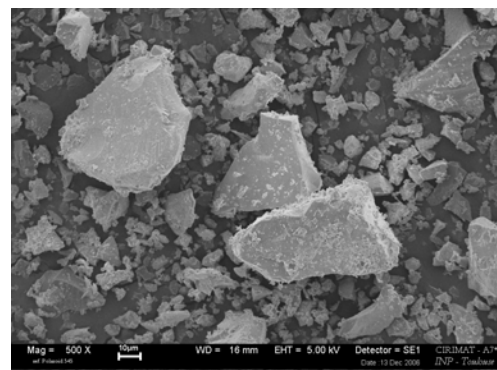
Echantillon	Ca % ($\pm 0,5$ %)	BP % ($\pm 0,5$ %)	Ca/BP (± 1 %)
Ca_2BP	2,45	11,06	1,94
CaBP (A)	1,03	10,10	0,89
CaBP (B)	1,10	7,89	1,23



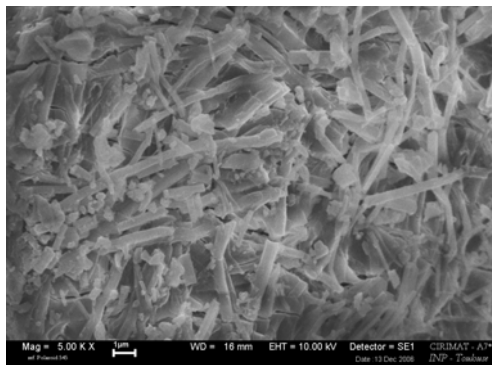
BP



Ca₂BP



CaBP(A)



CaBP(B)

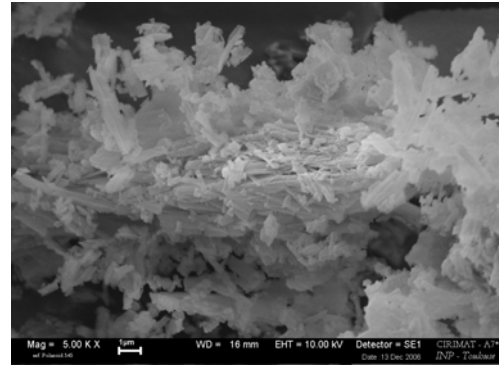


Figure II B-10: Observations par MEB du risédronate de sodium (BP) et des sels du risédronate de calcium.

II-3- Etude complexométrique

II-3-1- Etude par conductimétrie

Afin d'étudier les interactions susceptibles d'avoir lieu dans des conditions physiologiques ($\text{pH} \sim 7,3$ et $T \sim 37^\circ\text{C}$) entre les ions calcium et le risédronate monosodique, la conductivité ionique corrigée (χ_c) d'une solution aqueuse de risédronate de concentration donnée ($2,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) a été suivie en fonction de l'ajout (2ml/min) d'une solution de nitrate de calcium de concentration connue (10^{-2} M). Le dispositif expérimental utilisé est présenté ci-dessous (Figure II B-11).

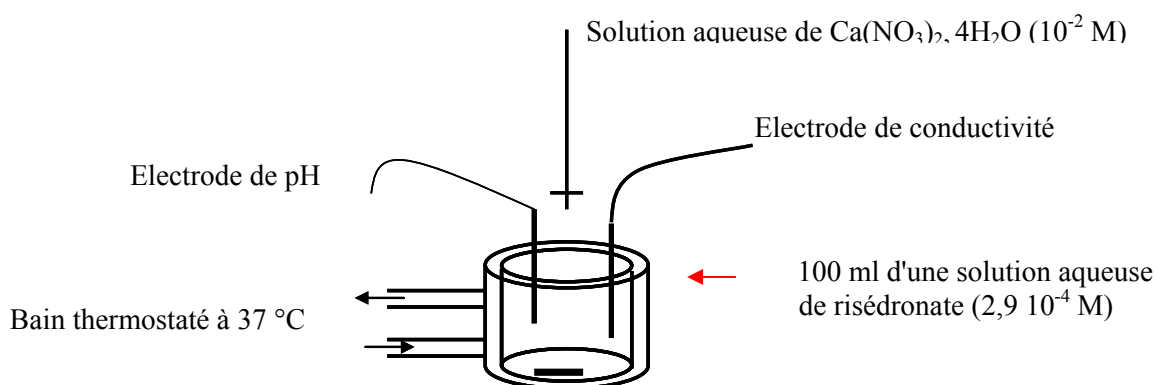


Figure II B-11: Dispositif expérimental de mesure de conductivité

En l'absence de risédronate, la courbe témoin obtenue est une droite (Figure II B-11) de pente proche de $33 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, caractéristique de l'ajout de nitrate de calcium dans le milieu.

La courbe obtenue pour la solution contenant du risédronate (Figure II B-12 « BP »), comparée à celle du témoin, montre deux segments de droites de pentes différentes. Au-delà du point d'intersection des deux segments, la droite ascendante montre une pente similaire à celle de la courbe témoin ($\sim 33 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$); cette allure est caractéristique de l'ajout de nitrate de calcium dans le milieu et traduit donc l'absence d'interaction entre ions calcium et molécules de bisphosphonates. Le changement de pente noté est progressif et devient total lorsque la pente prend la valeur de celle de la droite témoin; la quantité en ions calcium relative à ce changement de pente est aux alentours de 5-6 mL (soit environ $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$). Le rapport Ca/BP présent dans le milieu se rapproche alors de 2. Par ailleurs, le segment en dessous du point d'intersection présente une faible valeur de pente ($\sim 19 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) et traduit la consommation des ions calcium suite à leur interaction avec le risédronate. Cette association du calcium et du risédronate pourrait être le résultat de la formation de sels

de risédronate de calcium. Il est à noter que le changement de pente ne s'accompagne pas instantanément de la formation d'un précipité visible; l'apparition de ce précipité est progressive, ce qui pourrait expliquer que le changement de pente n'est pas brutal mais progressif.

Par ailleurs, l'addition des ions calcium dans la solution de bisphosphonates s'accompagne d'une diminution de pH (7,3 à 6,3), ce qui témoigne du passage de protons H^+ en solution (Figure II B-13); cette baisse est moins importante (7,3 à 6,8) dans la solution aqueuse sans risédronate (témoin).

III-3-2- Caractérisations du précipité obtenu

Lorsque la quantité de calcium ajoutée est assez importante ($V \geq 10$ ml) et/ou que le temps de réaction est suffisamment long, le milieu réactionnel devient trouble. Le précipité blanc ainsi formé a été immédiatement isolé par filtration sur millipore ($0,45 \mu m$), séché une nuit à $37^\circ C$ puis analysé par spectroscopie infrarouge. Le spectre IR obtenu (Figure II B-14) a été comparé à celui du sel de sodium (BP) et du sel Ca_2BP .

Les différences principales notées par rapport au sel de sodium concernent :

- la disparition des bandes attribuées aux modes de vibration des groupements (OH) et l'apparition de bandes larges vers 3400 cm^{-1} et 1640 cm^{-1} attribuées à l'eau de structure.

- le déplacement des bandes attribuées aux groupements PO_3 et élargissement de celles-ci après interaction avec le calcium.

- la disparition de la bande de vibration des liaisons P-OH (935 cm^{-1}) dans les groupements phosphonate et apparition d'une bande vers 985 cm^{-1} .

- les bandes de vibrations des liaisons P-C ont été déplacées vers la région $680 - 801 \text{ cm}^{-1}$.

Nous remarquons en outre que le spectre IR du précipité récupéré Ca_xBP_y est similaire à celui du Ca_2BP précédemment synthétisé et analysé; ceci est en accord avec la valeur du rapport Ca/BP (proche de 2) correspondant au changement de pente relevé par conductimétrie. La faible quantité de précipité récupéré lors de cette étude complexométrique ne nous a pas permis d'approfondir notre investigation.

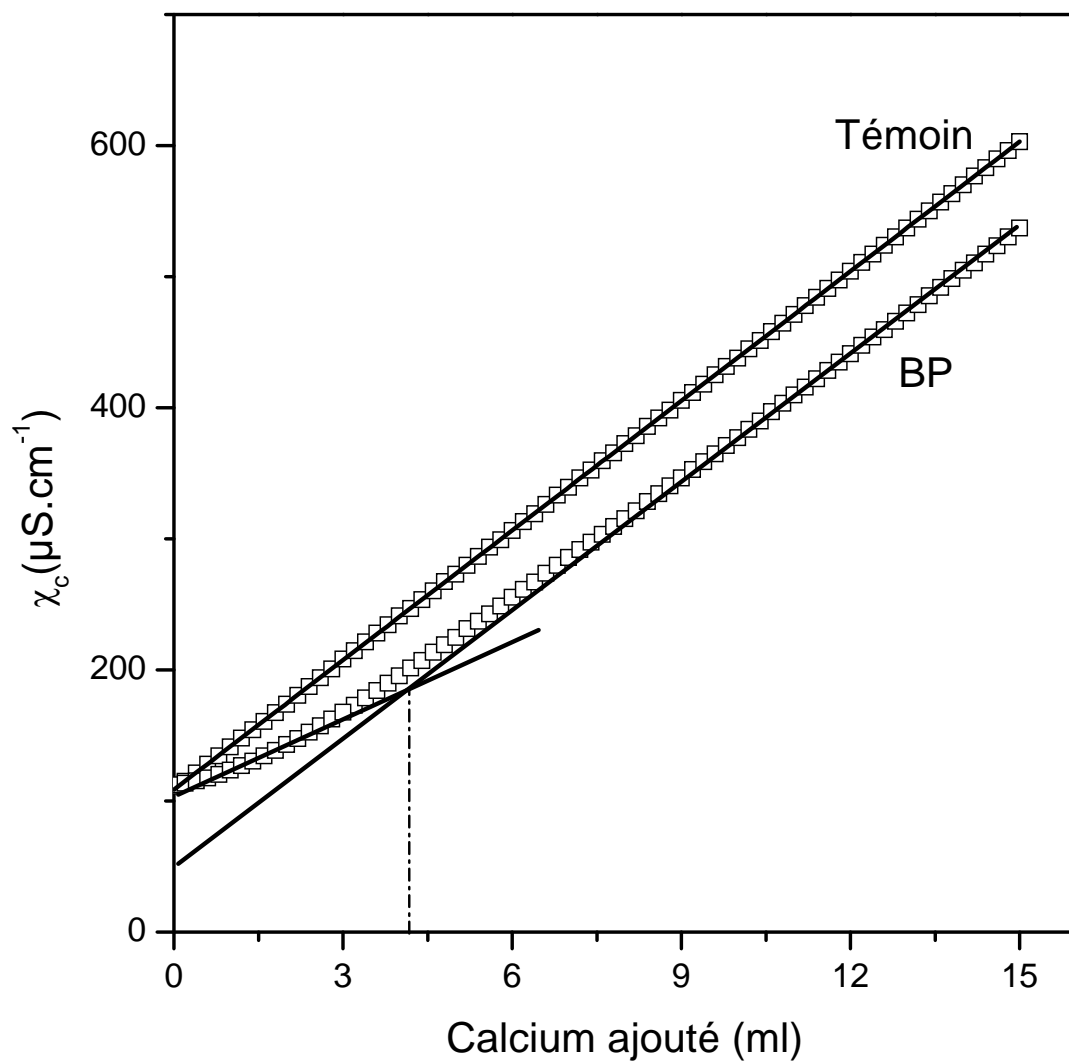


Figure II B-11: Variation de la conductivité corrigée en fonction du volume de solution queuse de calcium ajoutée ($[\text{Ca}] = 10^{-2} \text{ M}$) sans risédronate (témoin) et en présence de risédronate de concentration ($[\text{BP}] = 2,910^{-4} \text{ M}$).

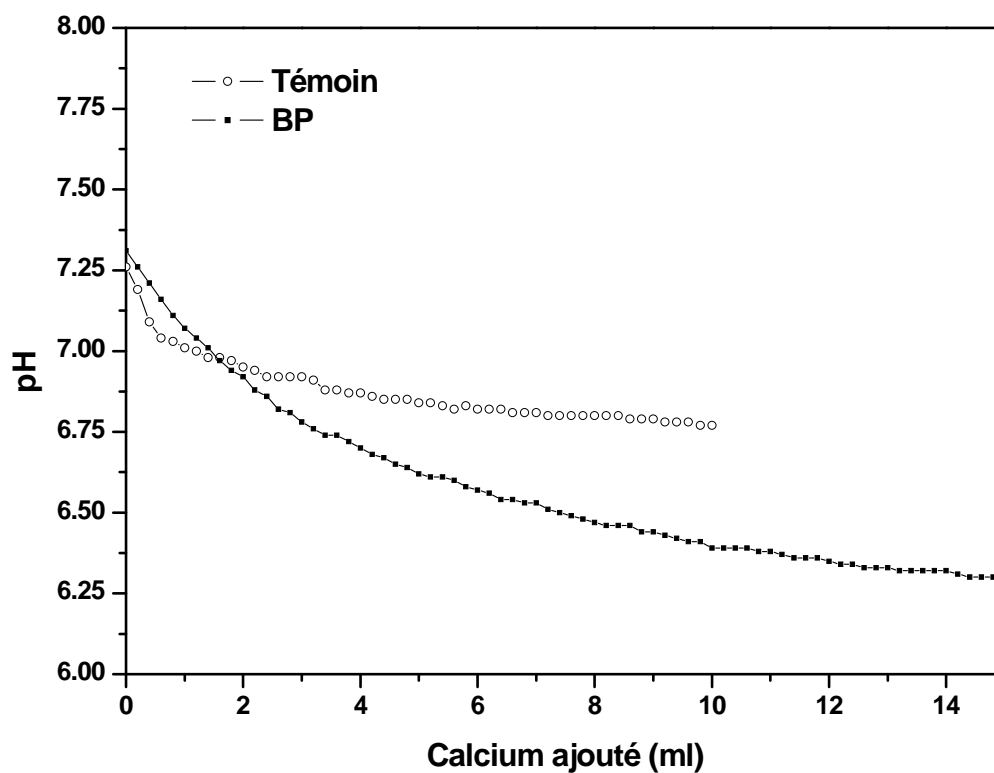


Figure II B-12: Variation du pH en fonction du volume de solution aqueuse de calcium ajoutée ($[Ca] = 10^{-2}$ M) sans risédronate (témoin) et en présence de risédronate ($[BP] = 2,9 \cdot 10^{-4}$ M).

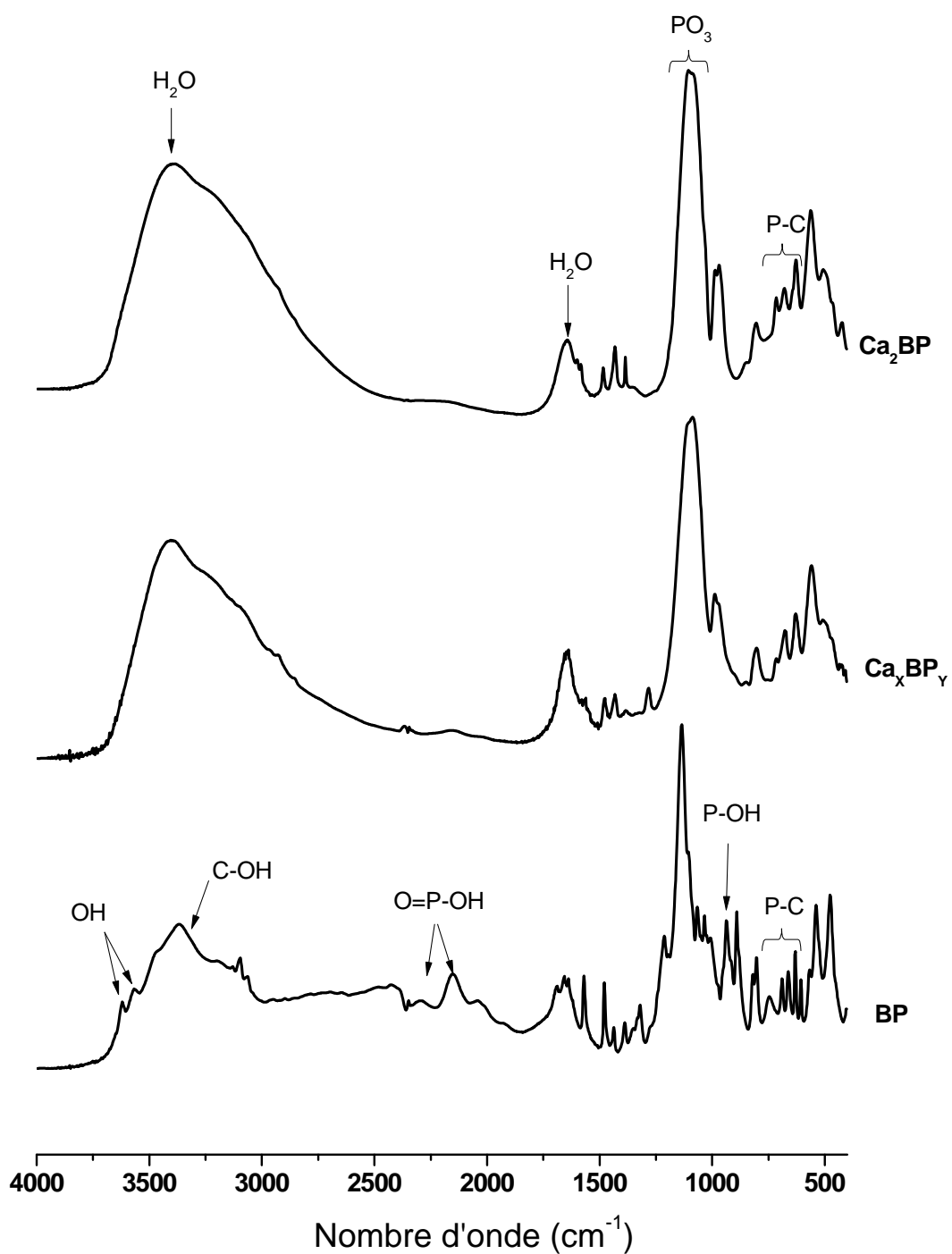


Figure II B-13: Spectres infrarouge du risédronate monosodique (BP), du sel de risédronate de calcium formé (Ca_xBP_y), et du précipité Ca_2BP synthétisé.

III- DISCUSSION

L'étude menée par les différentes techniques physico-chimiques montre d'une manière générale que la réaction en solution des ions calcium avec les molécules de bisphosphonate peut donner lieu, selon les conditions expérimentales, à deux types de précipités: des composés amorphes (Ca_2BP) ou cristallins (CaBP(A) et CaBP(B)). Des observations similaires ont été rapportées pour la réaction de l'étidronate (molécule modèle des bisphosphonates) en présence d'une solution de calcium (Browning et Fogler, 1996).

Dans le but de clarifier les phénomènes observés, les réactions chimiques qui gouvernent la formation de chaque type de précipité doivent être établies. Dans les conditions de pH examinées ($6,8 < \text{pH}_{\text{final}} < 9,7$), les espèces bisphosphonate prédominantes sont de forme H_2BP^{2-} et HBP^{3-} . Cependant, on ne peut pas pour autant en conclure que les formes CaBP et Ca_2BP sont favorisées sans prendre en compte les solubilités respectives des différents sels susceptibles de se former.

Pour le sel CaBP , la réaction de précipitation est la suivante:



La constante d'équilibre (K_1) de cette réaction s'exprime par la relation:

$$K_1 = \frac{a_{\text{CaH}_2\text{BP}}}{a_{\text{Ca}^{2+}} a_{\text{H}_2\text{BP}^{2-}}} = \frac{1}{Ks_1} \quad (2)$$

où a_i désigne l'activité de l'espèce « i » et Ks_1 le produit de solubilité du sel CaH_2BP .

De la même manière, la réaction chimique correspondant à la formation du sel Ca_2BP s'écrit:



$$K_2 = \frac{a_{\text{Ca}_2\text{BP}} a_{\text{H}^+}}{a_{\text{Ca}^{2+}}^2 a_{\text{HBP}^{3-}}} = \frac{1}{Ks_2} \quad (4)$$

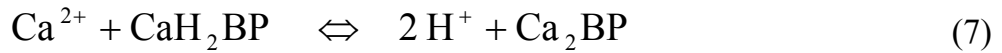
En plus de ces deux réactions, l'équilibre de dissociation impliquant les espèces prédominantes dans le domaine du pH exploré doit être également pris en considération :



$$K_{a_4} = \frac{a_{\text{HBP}^{3-}} a_{\text{H}^+}}{a_{\text{H}_2\text{BP}^{2-}}} \quad (6)$$

K_{a_4} désigne la constante de la quatrième acidité du risédronate.

A partir de ces équations établies, un équilibre reliant les deux types de précipités peut être exprimé de la manière suivante:



En mettant une valeur de 1 pour l'activité des sels de calcium de risédronate, la constante d'équilibre correspondante (K) devient:

$$K = \frac{a_{\text{H}^+}^2}{a_{\text{Ca}^{2+}}} = K_{a_4} \frac{K_2}{K_1} = K_{a_4} \frac{K_{s1}}{K_{s2}} \quad (8)$$

Il est maintenant clair à partir de l'équation 7 et la constante d'équilibre correspondante (8) que l'augmentation de la teneur en ions calcium et/ou la diminution de la concentration des protons (augmentation du pH) aura pour effet un déplacement de l'équilibre 7 vers la droite et favorisera donc la formation du précipité Ca_2HBP .

Ces observations montrent clairement que la nature du précipité formé dépend fortement du pH du milieu réactionnel et du rapport Ca/BP en solution. En fait, l'habilité des molécules de risédronate à précipiter en présence des ions calcium dépend fortement de la capacité des groupements phosphonate de ces molécules à perdre des protons et donc constituer des sites favorables pour l'attaque des ions calcium. Ce processus de déprotonation est assez dépendant du pH des solutions de précipitation. Cela a un impact direct sur le nombre d'ions calcium capable de se lier aux groupements phosphonate de la molécule. Des études similaires menées sur les précipités obtenus entre ions calcium et le diéthylentriamine penta (méthylénephosphonique acide - DTPMP), un acide phosphonique contenant 5 groupements phosphonate, ont montré qu'à des valeurs de pH comprises entre 4 et 5,5, trois ions calcium peuvent former des liaisons avec le DTPMP (Kan et al., 1994).

Nous avons montré par l'intermédiaire de différentes techniques de caractérisation que les précipités CaBP(A) et CaBP(B) obtenus dans un rapport molaire Ca/BP en solution de 1, sont de même nature cristalline mais de morphologies différentes. Cette différence peut être due, en plus du pH, au degré de sursaturation du milieu réactionnel. Ce dernier paramètre dépend à la fois des concentrations initiales en ions calcium et risédronate utilisées ainsi que de la solubilité des précipités formés. Il a été montré dans le cas des précipités d'etidronate de calcium formés à des pH acides, que le degré de sursaturation affecte considérablement la forme et la taille des

crystallites obtenus (Browning et Fogler, 1995). Cela est dû essentiellement à l'influence du degré de sursaturation sur la nucléation des cristaux et leur croissance cristalline.

IV- CONCLUSION

Ce travail nous a amené, dans un premier temps, à préparer des sels de risédronate de calcium. Pour cela diverses conditions expérimentales ont été adoptées. Nous avons noté que la précipitation des sels de calcium de risédronate était gouvernée par différents facteurs (pH et rapport Ca/BP en solution). L'examen des poudres obtenues par différentes techniques de caractérisation physico-chimiques nous a permis d'identifier trois familles de sels de calcium de risédronate :

Ca₂BP : obtenu à de forte concentration et à pH basique dans un rapport Ca/BP en solution de 2. Dans ces conditions la précipitation est rapide et le produit obtenu est amorphe, de rapport final Ca/BP de 2.

CaBP(A) : obtenu à de forte concentration et à pH légèrement acide dans un rapport Ca/BP en solution de 1. le composé formé est bien cristallisé et présente un rapport molaire Ca/BP de 0,9.

CaBP (B) : obtenu à de faible concentration et à pH basique avec un rapport Ca/BP en solution de 1. La précipitation est plus lente et le produit cristallisé issu montre un rapport molaire Ca/BP de 1,2.

Dans une seconde étape, l'étude complexométrique a permis de mettre en évidence les interactions susceptibles d'avoir lieu dans des conditions physiologiques entre les ions calcium et le risédronate monosodique. Le sel de calcium alors récupéré est proche du Ca₂BP précédemment décrit.

Les résultats de ce chapitre seront d'un apport considérable à la compréhension des phénomènes susceptibles de se produire à la surface du minéral osseux. L'étude de l'adsorption du risédronate sur les modèles osseux apatitiques ne pourra être complète que par une caractérisation fine des solides récupérés après adsorption. Aussi l'étude des sels de calcium du risédronate constitue un point de départ important pour la suite de ce travail de thèse.

Chapitre III

ADSORPTION DU RISEDRONATE MONOSODIQUE PAR L'HYDROXYAPATITE

I- INTRODUCTION

L'étude des phénomènes qui interviennent à l'interface entre phosphates de calcium et molécules biologiquement actives a fait l'objet de nombreux travaux en raison de leur importance dans le domaine biomédical. Parmi ces principes actifs, les bisphosphonates (BPs) ont retenu l'attention de plusieurs chercheurs durant ces dernières décennies. Il a été bien établi *in vitro* que les effets physico-chimiques de divers BPs sont similaires à ceux du pyrophosphate et que ces espèces inhibent la formation, l'agrégation, et ralentissent également la dissolution des cristaux de phosphate de calcium (Fleisch, 2003). Ces effets ont été attribués à l'affinité marquée des groupements phosphonate de ces molécules pour la surface du matériau phosphocalcique. Nancollas et al. (2006) ont rapporté que cette affinité dépend fortement de la structure chimique de la molécule, et spécialement du groupement situé sur la chaîne carbonée.

Divers modes d'interaction des bisphosphonates avec l'hydroxyapatite ont été proposés. Selon Josse et al. (2005), la fixation du zolédronate est gouvernée par un phénomène d'échange ionique entre les groupements phosphonate de la molécule et phosphate de la surface du support HA. Un phénomène similaire a été observé pour l'interaction *in vitro* de différents bisphosphonates vis-à-vis de l'os humain (Mukherjee et al., 2008). Par ailleurs, l'étude menée par Raman et RMN du solide sur les supports obtenus après adsorption de l'etidronate (Curkrowski et al., 2007) suggère la formation de complexes avec les sites calcium à la surface de l'hydroxyapatite. La formation de cristaux solides en surface a aussi été notée lors de l'interaction du zolédronate avec le phosphate tricalcique- β (Roussière et al., 2008). Cependant peu d'études systématiques ont été engagées sur le rôle des ions minéraux dans le processus d'adsorption des bisphosphonates à la surface des apatites et les données d'adsorption sur le risédronate sont rares.

Dans cette perspective, nous nous proposons dans ce chapitre d'examiner l'influence de la composition du milieu sur la fixation et la libération des BPs, d'une part, et de corrélérer entre les teneurs des ions minéraux libérés en solution et les espèces BPs adsorbées, d'autre part. Cette approche nous permet de quantifier les échanges susceptibles d'avoir lieu entre la solution et les particules solides de l'apatite. En outre, la caractérisation des poudres issues des tests d'adsorption, moyennant différentes techniques physico-chimiques (DRX, FTIR, Raman, RMN de l'état solide et analyses chimiques), permettrait de mieux comprendre l'évolution du système et déceler toute éventuelle modification structurale, altération morphologiques des solides et/ou formation de sels insolubles.

II- ADSORPTION DU RISEDRONATE PAR L'HYDROXYAPATITE

II-1- Matériaux et méthodes

II-1-1- Protocole expérimental

Les tests d'adsorption peuvent être réalisés soit par suivi de la diminution de la concentration de l'adsorbat dans la solution ou par dosage de la quantité fixée à la surface du solide. Toute éventuelle désorption (*partielle ou totale*) des molécules d'adsorbats lors du lavage du solide, conduirait à des résultats erronés lors de la quantification des espèces fixées par l'adsorbant. Pour ces raisons, nous avons opté pour la première méthode.

II-1-2- Adsorbant et adsorbat

L'adsorbant utilisé dans cette étude est une apatite de synthèse obtenue par précipitation en 3 heures. Il s'agit d'une hydroxyapatite (HA) bien cristallisée, légèrement déficiente en calcium ($\text{Ca/P} = 1,64$) et présentant une surface spécifique de $59 \text{ m}^2/\text{g}$.

Le bisphosphonate que nous avons utilisé est le risédronate monosodique semi penta hydraté fourni par les laboratoires Procter & Gamble Pharmaceuticals. Ce principe actif rentre dans la composition de comprimés commercialisés sous le nom « d'Actonel ». Nous rappelons que le risédronate monosodique sera désigné par BP (bisphosphonate).

Les différentes caractéristiques physico-chimiques de ces matériaux ont fait l'objet du deuxième chapitre de ce manuscrit.

II-1-3- Adsorption

Les solutions utilisées comme milieu d'adsorption sont fraîchement préparées; elles ont été obtenues en dissolvant la quantité appropriée de risédronate dans une solution standard de chlorure de potassium (KCl, 1 mM) ou dans le même milieu contenant du chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$; 0-0,2 mM) ou du phosphate de potassium (KH_2PO_4 ; 0-10 mM). Dans certains cas, la force ionique des solutions d'adsorption a été ajustée par addition de solutions de KCl (0-10 mM). Le pH des solutions d'adsorbats ($\text{pH}_{\text{initial}}$) a été ajusté selon le cas, par addition d'une solution de KOH (0,5-3,5 M) et/ou d'une solution de HCl (0,5-2,5 M).

La démarche adoptée pour nos tests d'adsorption repose sur des expériences réalisées en conditions statiques, sous forme de tests en «batch». Le dénominateur commun de ces tests est la mise en suspension des poudres d'apatites (50 mg) dans des tubes en polyéthylène de contenance 10 ml, avec 5 ml de solutions d'adsorption. La gamme de concentration examinée varie entre 0 et 5,7 mM. Après agitation des

suspensions aux ultrasons (2 à 3 min), les tubes ont été incubés durant deux heures dans une étuve dont la température a été préalablement fixée à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ou à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Les suspensions ainsi obtenues ont été centrifugées durant 20 min à 15000 tr/min, puis filtrées sur millipore ($\varnothing 0,2 \mu\text{m}$). Les mesures du pH d'équilibre ($\text{pH}_{\text{équilibre}}$ ou $\text{pH}_{\text{adsorption}}$) ont été réalisées sur le surnageant obtenu après chaque test d'adsorption.

Dans tous les cas, des témoins contenant seulement la solution de bisphosphonates ont été traités dans les mêmes conditions que les expériences d'adsorption, afin de tenir compte de toute éventuelle fixation d'adsorbat sur les parois des tubes utilisés. Nous avons conclu qu'aucune adsorption du risédronate ne se produit sur les parois des tubes.

La quantité de bisphosphonate adsorbée (Q) a été déterminée par différence entre la concentration initiale de la solution d'adsorbat (C_o) et celle obtenue à l'équilibre (C_e) selon la relation :

$$Q = (C_o - C_e) \times \frac{V}{m}$$

où V désigne le volume de la solution utilisé (L) et m la masse de l'adsorbant (g). La quantité adsorbée Q peut être rapportée à l'unité de masse ou de surface spécifique du support. Des tests d'adsorption ont été réalisés plusieurs fois (2 à 3 fois) afin d'estimer l'erreur sur la quantité d'adsorbat fixée à la surface du support. La reproductibilité de nos observations expérimentales a été estimée à environ 5 %.

II-1-4- Réversibilité

L'examen de la réversibilité du processus de fixation des molécules de risédronate a été examiné vis-à-vis de la dilution. Pour cela, une quantité bien définie du surnageant obtenu après adsorption a été remplacée soit par un volume égal d'une solution de KCl (1mM, $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$) pré-équilibrée dans les mêmes conditions d'adsorption en présence du solide, soit par une solution de $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$ contenant du KCl (1mM) et du KH_2PO_4 (0-25 mM). La nouvelle suspension a été incubée pendant 2 h; après centrifugation, le surnageant obtenu a été analysé afin de déterminer la quantité de risédronate éventuellement libérée par le solide. Ces tests de la réversibilité vis-à-vis de la dilution ont été réalisés aux températures $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

II-1-5- Etude de libération

Les tests d'adsorption ont été réalisés dans des conditions physiologiques de pH et température ($\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$ et $T \sim 37^\circ\text{C}$) avec une concentration initiale en adsorbat représentative du plateau de saturation ($C_o = 3,25 \text{ mM}$).

Les échantillons d'apatites récupérés après centrifugation ont été lavés à trois reprises avec 100 ml de solution aqueuse décarbonatée ($\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$) puis séchés à l'étuve. L'analyse des eaux issues des opérations de lavage indique qu'aucune désorption des molécules de risédronate initialement fixées par les cristaux de l'apatite n'a été détectée.

Les poudres ainsi obtenues ont été remises en suspension, soit avec 5 ml de solution de chlorure de potassium (KCl, 1 mM) préalablement équilibrée en présence du solide HA, soit avec 5 ml d'une solution contenant du chlorure de potassium (KCl, 1 mM) et du phosphate de potassium (KH_2PO_4 , 10 mM). Le pH initial de ces milieux de désorption utilisés a été ajusté à des valeurs de 4,5, 7,4 et 9,5. Les nouvelles suspensions ont ensuite été incubées à $T \sim 37^\circ\text{C}$ pour des périodes allant de 1 heure à 3 jours. Après centrifugation, les surnageants récupérés ont fait l'objet d'analyse pour déterminer toute éventuelle libération des molécules de risédronate.

II-1-6- Analyse chimique

Le dosage du risédronate dans les solutions d'adsorption a été réalisé par spectrophotométrie UV-Visible à 262 nm. Les détails relatifs à cette méthode ont été décrits dans la partie B du deuxième chapitre de ce manuscrit.

La quantification des espèces phosphore et calcium dans les filtrats a été réalisée respectivement par colorimétrie utilisant le complexe phospho-vanado-molybdique et par spectrométrie d'émission optique par plasma à couplage inductif (ICP/OES). Les solutions d'adsorption ont également été examinées par RMN ^{31}P du liquide.

II-2- Résultats

II-2-1- Cinétique d'adsorption

La durée de contact adsorbant-adsorbat nécessaire pour atteindre l'équilibre a été déterminée en milieu KCl (1 mM ; $\text{pH}_{\text{initial}} 7,4$) avec une concentration initiale en adsorbat voisine de 0,86 mM. L'évolution de la quantité de risédronate adsorbée a été reportée en fonction de la durée d'incubation (Figure III-1). Comme on peut le voir, l'équilibre est atteint environ 20 min après addition de la solution de risédronate à l'apatite, attestant ainsi de la rapidité du processus de fixation du BP par le support dans les conditions examinées.

Pour la suite de notre étude relative à l'échantillon HA, nous avons opté pour une durée de contact de 2 h, temps largement suffisant pour atteindre l'équilibre.

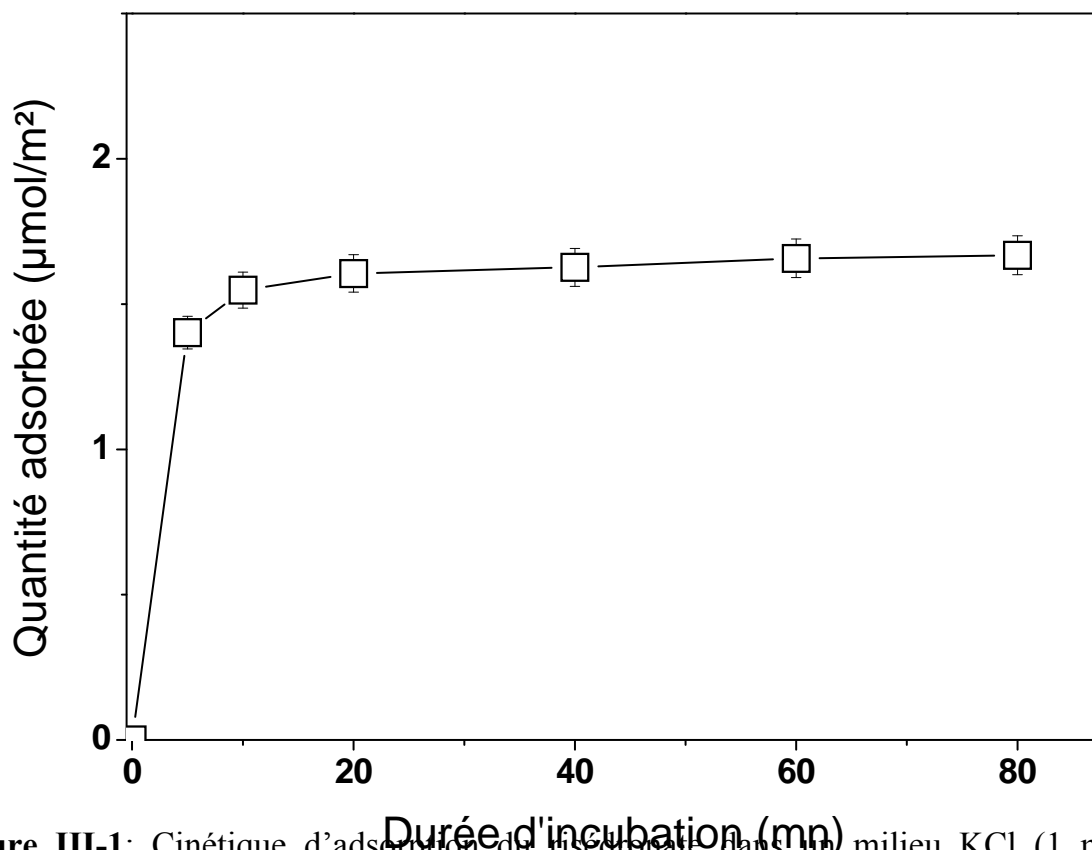


Figure III-1: Cinétique d'adsorption du risédronate dans un milieu KCl (1 mM) par HA à $T \sim 37^{\circ}\text{C}$ et $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$.

II-2-2- Isotherme d'adsorption

Les expériences d'adsorption menées avec des solutions en risédronate ($\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$) de concentrations couvrant la gamme de 0 à 3,8 mM ont été réalisées à températures voisines de 37°C et 25°C . Le pH des suspensions obtenues à l'équilibre ($\text{pH}_{\text{adsorption}}$) avoisine 7,7. Une simple comparaison des résultats obtenus dans les conditions examinées (Tableau III-1) montre une grande capacité d'adsorption des cristaux de HA à la température 37°C , comparée à 25°C . En effet, pour des solutions de concentration initiale identique, le taux d'adsorption à température physiologique varie entre 91% et 42%, tandis que cette variation est de 84% et 32% à température ambiante.

Tableau III-1: Données d'adsorption du risédronate à $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$ par HA à 37°C et à 25°C: concentration initiale (C_0), concentration à l'équilibre (C_e), quantité fixée (Q) et pourcentage d'adsorption (%).

Température 25 °C				Température 37 °C			
C_0 (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Ads (%)	C_0 (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Ads (%)
0	0	0	0	0	0	0	0
0,12	0,02	0,18	84	0,25	0,02	0,38	91
0,35	0,05	0,52	87	0,52	0,03	0,84	95
0,45	0,06	0,66	86	0,69	0,05	1,08	92
0,56	0,09	0,81	85	0,82	0,07	1,27	92
0,82	0,20	1,04	75	1,03	0,16	1,48	85
1,17	0,44	1,24	62	1,41	0,32	1,85	77
1,83	0,93	1,53	49	2,12	0,97	1,95	54
2,84	1,92	1,56	32	2,83	1,64	2,02	42

La variation de la quantité de risédronate retenue par l'échantillon HA, en fonction de sa concentration à l'équilibre, est décrite par une isotherme de type Langmuir, et ce pour les deux températures examinées (Figure III-2). L'allure des courbes obtenues indique que le plateau de saturation est atteint pour des faibles concentrations en risédronate, ce qui atteste de la grande affinité des molécules d'adsorbat pour la surface du support.

Les paramètres caractéristiques de l'adsorption, à savoir la quantité adsorbée à la saturation N ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) et la constante apparente d'affinité de l'adsorbat pour la surface du solide K (L/mmol), ont été déterminées à partir de l'équation de Langmuir ($Q = KNC / (1+KC)$) linéarisée sous la forme suivante:

$$\frac{C_e}{Q} = \frac{C_e}{N} + \frac{1}{KN}$$

L'évolution de C_e/Q en fonction C_e donne lieu à des droites (Figure III-2) avec des coefficients de corrélation d'environ 99,9%. Les valeurs des paramètres caractéristiques de l'adsorption (K et N) ainsi déduites sont regroupées dans le tableau III-2. L'augmentation de la température se traduit par une élévation à la fois de la quantité adsorbée à la saturation (N) et de l'affinité apparente (K) de l'adsorbat pour la surface du minéral. La quantité de molécules de risédronate fixée à la saturation dans les conditions étudiées donne lieu à une surface occupée (δ) de 0,7 à 1,1 nm^2 par molécule. Cette valeur a été estimée en tenant compte de la surface spécifique de l'apatite considérée et de la quantité adsorbée à la saturation (mol/g) selon l'équation :

$$\delta = \frac{S_{\text{BET}}}{N \times 6,02 \cdot 10^{23}}$$

L'étude menée sur l'interaction de HA avec le pamidronate et l'étidronate (Claessens et Kolar., 2000; Vitha et al., 2008) montre les mêmes capacités de rétention. Cependant différentes valeurs de la constante d'affinité K sont reportées pour des molécules appartenant à la famille de bisphosphonate, et parfois pour la même espèce tel l'étidronate. Ces divergences pourraient être en partie liées aux conditions expérimentales adoptées par les auteurs (gamme de concentration explorée, peu de points expérimentaux exploités dans la partie ascendante de l'isotherme...).

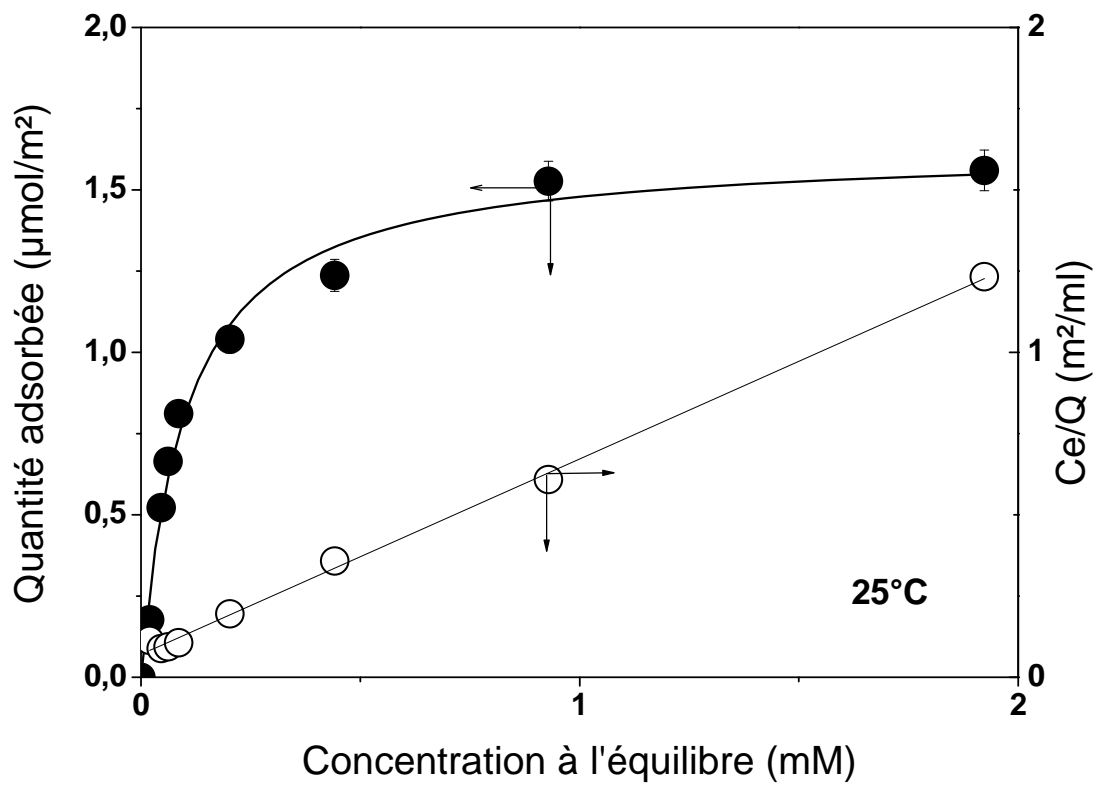
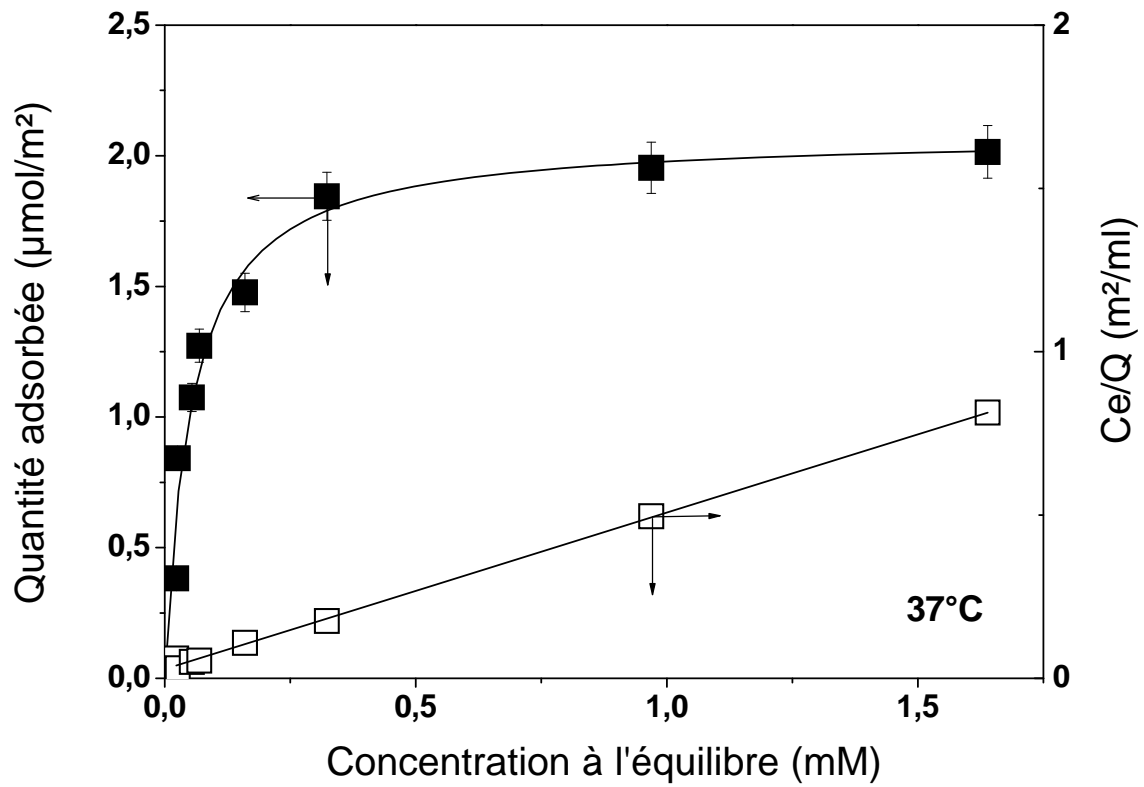


Figure III-2: Isothermes d'adsorption du risédronate par HA dans un milieu KCl (1mM ; $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$) à 37°C et à 25°C.

Tableau III-2: Paramètres d'adsorption du risédronate par HA en milieu KCl (1 mM ; pH_{initial} ~ 7,4) à 37°C et à 25°C.

	N ± ΔN (μmol/m²)	K ± ΔK (L/mmol)	δ (nm²)
Risédrone (37°C)	2,3 ± 0,1	7,3 ± 3,6	0,7
Risédrone (25°C)	1,7 ± 0,1	8,6 ± 1,2	1,1
Pamidronate (25°C) (Vitha et al., 2008)	1,8	44	0,8 – 1,0
Etidronate (25°C) (Vitha et al., 2008)	1,5	53	0,8 – 1,0
Etidronate (25°C) (Claessens et Kolar, 2000)	2,9	3,3	0,6

II-2-3- Réversibilité du processus

La figure III-3 donne les isothermes d'adsorption du risédronate par HA à pH_{initial} voisin de 7,4 et de désorption vis-à-vis de la dilution par une solution de KCl (1 mM) pré-équilibrée en présence du solide, et ce pour les deux températures examinées. La non superposition des points d'adsorption et de désorption traduit que le processus est pratiquement irréversible dans les conditions expérimentales examinées. Cette observation suggère que les molécules initialement fixées à la surface de l'apatite ne sont pas déplacées de leur site d'attache par simple dilution avec une solution de KCl.

Cependant, l'étude de la réversibilité vis-à-vis de la dilution en présence des ions phosphate (0-25 mM) montre une tendance différente (Figure III-4). L'ajout de ces espèces dans le milieu favorise le déplacement des molécules d'adsorbats de la surface de l'HA et leur mise en solution; la quantité de risédronate désorbée augmente avec la teneur en ions phosphate ajoutés.

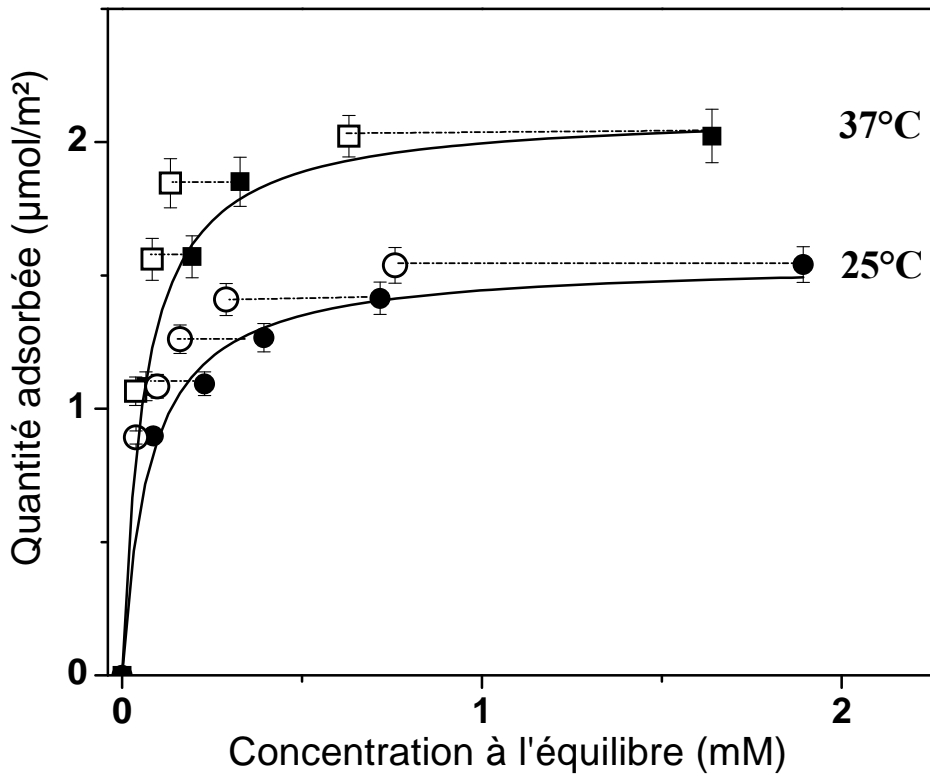


Figure III-3: Isothermes d'adsorption (symbole fermé) et de désorption (symbole ouvert) de risédronate par HA en milieu KCl (1 mM; $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$).

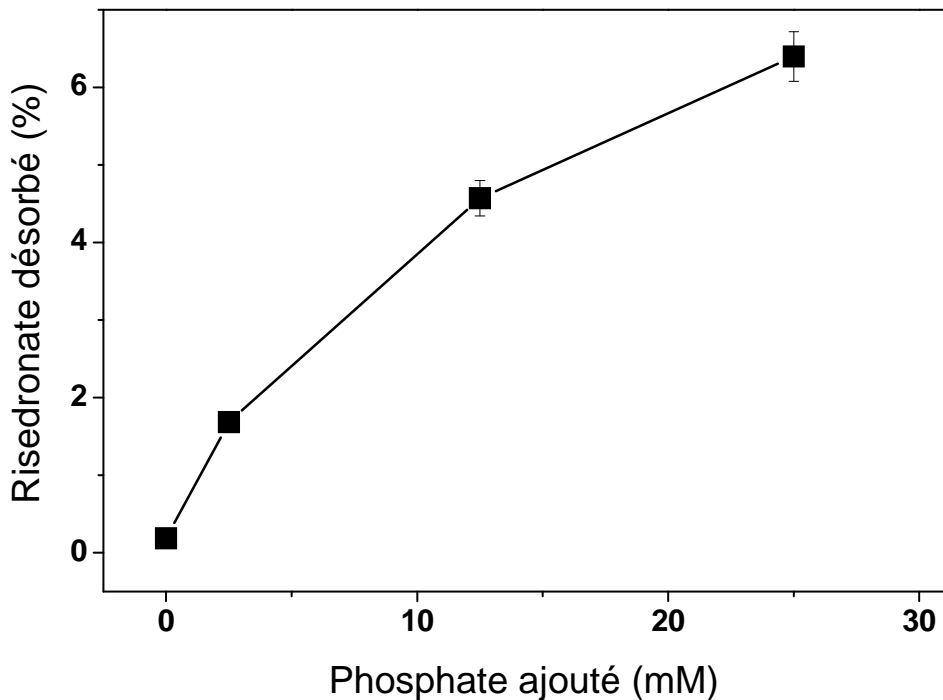


Figure III-4: Evolution de la quantité de risédronate libérée en fonction de la quantité de phosphate ajoutée ($T \sim 37^\circ\text{C}$; $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$; milieu KCl 1 mM contenant du KH_2PO_4).

II-2-4- Libération du risédronate

L'étude de libération a été réalisée avec des solutions contenant soit du KCl seul (1mM; T ~ 37°C), soit du KCl additionné de KH₂PO₄ (10 mM); ces tests ont été menés sur des poudres de HA ayant fixée une quantité de risédronate correspondante au plateau de saturation ($Q_{ads} = 2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$; $\text{pH}_{initial} 7,4$; $\text{pH}_{ads} \sim 7,7$ et T ~ 37°C). Les pH des solutions de désorption ont été initialement ajustés ($\text{pH}_{initial}$) à des valeurs de 4,5, 7,4 et 9,5; les pH des surnageants ($\text{pH}_{équilibre}$) obtenus après incubation de 3 jours dans un milieu KCl (1 Mm) sont respectivement de 6,5, 7,3 et 7,9. Comme on peut le voir (Tableau III-3), le taux de libération dépend à la fois de la nature de l'électrolyte, du pH du milieu et de la durée d'incubation: le taux de relargage le plus important est obtenu lorsque l'éluant est un phosphate à pH basique.

L'analyse des résultats obtenus indique qu'aucune libération significative ne se produit en présence du chlorure de potassium seul; dans ces conditions, le taux de libération du risédronate ne dépasse guère 5% même après 3 jours de traitement. Cependant, lorsque le milieu de traitement est additionné d'ions phosphate ce taux varie entre 8 et environ 30 % selon le pH du milieu.

Le profil de libération du support HA dans un milieu phosphate de $\text{pH}_{initial} 7,5$ (Figure III-5), valeur proche de celle du milieu d'adsorption, montre une augmentation progressive (15 à 21 %) lorsque le temps d'incubation passe de 1h à 72h. Par ailleurs, on note une légère diminution du taux de libération (1 à 4 %) lorsque le milieu de traitement est acide ou alcalin. Dans tous les cas, on assiste à une variation brusque du taux de libération durant les premières heures d'incubation.

Tableau III-3: Taux de libération à T~ 37°C de molécules de risédronate par HA en fonction du temps : solutions de KCl (1mM) et KCl (1mM) et de KH₂PO₄ (10 mM) à différents pH_{initial} (4,5, 7,4 et 9,5).

		Milieu de pH _{initial} 4,5	
		KCl (1mM)	KCl (1mM)+ KH ₂ PO ₄ (10mM)
Temps d'incubation (h)	Taux libéré ± 10 (%)		
1	1,11	9,56	
2	0,96	10,04	
24	0,44	8,91	
48	0,16	8,34	
72	0,11	7,99	
		Milieu de pH _{initial} 7,4	
		KCl (1mM)	KCl (1mM)+ KH ₂ PO ₄ (10mM)
Temps d'incubation (h)	Taux libéré ± 10 (%)		
1	2,48	14,95	
2	2,15	17,15	
24	1,98	17,70	
48	1,23	19,36	
72	0,81	21,32	
		Milieu de pH _{initial} 9,5	
		KCl (1mM)	KCl (1mM)+ KH ₂ PO ₄ (10mM)
Temps d'incubation (h)	Taux libéré ± 10 (%)		
1	5,13	29,27	
2	5,24	27,02	
24	5,15	26,23	
48	4,06	25,60	
72	3,89	25,31	

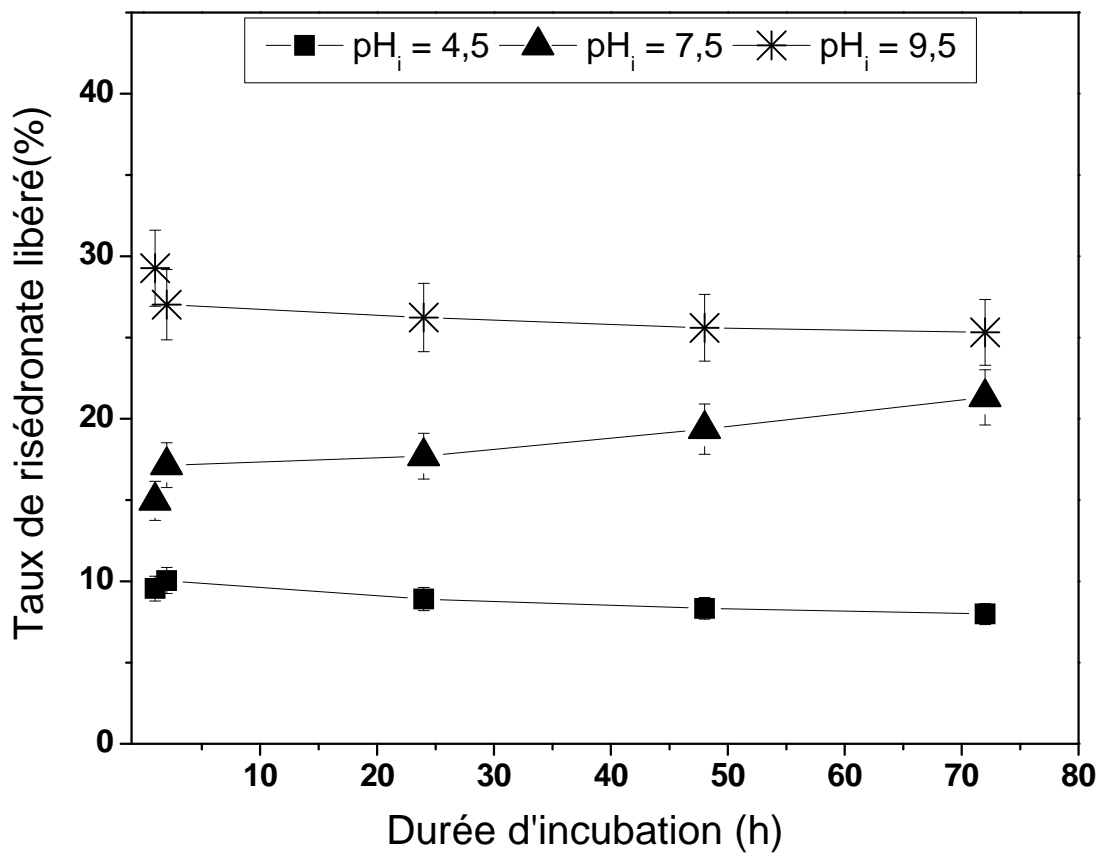


Figure III-5: Profil de libération de risédronate par HA dans un milieu KCl (1 mM) additionné de KH₂PO₄ (10 mM) à différents valeurs de pH_{initial}.

II-2-5- Influence de la composition chimique du milieu sur l'adsorption

II-2-5-1- Influence du pH

Le solide a été dispersé dans des solutions d'adsorbat dont les valeurs initiales de pH ont été ajustées à 4,8, 7,2 et 11; les valeurs de pH obtenues à l'équilibre ($pH_{\text{équilibre}}$) sont respectivement proches de 6,6, 7,5 et 9,5. Le tableau III-4 regroupe les données d'adsorption obtenues ainsi que les mesures de pH des solutions obtenues avant et après adsorption. Les isothermes d'adsorption obtenues en milieu KCl (1 mM) à 25°C aux différents pH considérés sont de type Langmuir (Figure III-6); les paramètres d'adsorption correspondant sont reportées dans le tableau III-7 (A).

L'examen des résultats obtenus montre que la variation du pH du milieu d'incubation affecte considérablement les propriétés d'adsorption du matériau. On remarque que l'élévation du pH des solutions d'adsorbat s'accompagne d'une diminution à la fois de la constante d'affinité (K) adsorbant-adsorbat et de la quantité adsorbée à la saturation (N) (Figure III-7). Il semble que les milieux acides favorisent l'adsorption des molécules de risédronate. Ainsi, la capacité de rétention du support à pH 6,6 est environ trois fois plus grande que celle notée à pH 9,5 (Tableau III-7 (A)).

II-2-5-2- Influence des ions phosphate

L'influence des ions phosphate ajoutés (1-10 mM) dans les solutions d'adsorption sur la fixation du risédronate par l'apatite a été examinée à 37°C et à pH 7,4. La force ionique du milieu (I) a été maintenue constante et proche de 11 mM; cette valeur a été fixée par la solution la plus concentrée en phosphates (10 mM). Pour les autres solutions, une quantité appropriée de KCl a été ajoutée. Les données d'adsorption sont regroupées dans le tableau III-5.

La comparaison des paramètres d'adsorption obtenus (Tableau III-7 (B)) suggère que la présence des ions phosphate dans le milieu inhibe l'adsorption des molécules de risédronate à la surface de l'apatite. En effet, les paramètres caractéristiques des isothermes d'adsorption diminuent lorsque la teneur de ces espèces ajoutées croît (Figure III-8).

Tableau III-4 : Données d'adsorption du risédronate par HA à 25°C aux pH étudiés : concentrations initiale (C_o) et à l'équilibre (C_e), quantité fixée (Q) et pH des solutions avant adsorption ($pH_{initial}$) et après adsorption ($pH_{équilibre}$).

$pH_{ads} = 6,6 \pm 0,1$

C_o (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	$pH_{initial} - pH_{équilibre}$
0,00	0,00	0,00	4,7 - 6,3
0,11	0,00	0,19	4,8 - 6,5
0,22	0,00	0,36	
0,33	0,01	0,55	
0,43	0,00	0,72	4,8 - 6,6
0,53	0,01	0,88	
0,79	0,03	1,29	
0,96	0,08	1,49	4,8 - 6,7
1,15	0,14	1,72	
1,33	0,24	1,83	
1,64	0,40	2,10	4,8 - 6,6

$pH_{ads} = 7,5 \pm 0,1$

C_o (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	$pH_{initial} - pH_{équilibre}$
0	0	0	7,2 - 7,3
0,12	0,02	0,18	7,2 - 7,5
0,35	0,05	0,52	
0,45	0,06	0,66	
0,56	0,09	0,81	7,3 - 7,5
0,82	0,20	1,04	
0,98	0,31	1,15	
1,17	0,44	1,24	7,2 - 7,5
1,37	0,53	1,43	
1,66	0,76	1,53	7,2 - 7,5

$pH_{ads} = 9,5 \pm 0,1$

C_o (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	$pH_{initial} - pH_{équilibre}$
0	0	0	11,0 - 9,1
0,13	0,08	0,08	11,2 - 9,5
0,22	0,12	0,16	
0,31	0,14	0,28	
0,39	0,17	0,38	10,8 - 9,5
0,49	0,24	0,42	
0,73	0,39	0,57	
0,99	0,62	0,63	10,9 - 9,5
1,09	0,69	0,69	
1,25	0,85	0,68	
1,56	1,15	0,69	11,1 - 9,6

Tableau III-5 : Données d'adsorption du risédronate par HA en milieu KCl (1 mM) contenant du phosphate de potassium (KH₂PO₄ 1-10 mM) : T ~ 37°C et force ionique I ~ 11 mM.

	C_o (mM)	C_e (mM)	Q (μmol/m²)
Phosphates ajoutés 1 mM	0,00	0,00	0,00
	0,30	0,01	0,49
	0,56	0,02	0,91
	0,99	0,13	1,46
	1,36	0,37	1,67
	1,68	0,61	1,81
	2,17	1,02	1,95
	2,56	1,38	2,00
	2,90	1,66	2,09
	3,78	2,49	2,18

	C_o (mM)	C_e (mM)	Q (μmol/m²)
Phosphates ajoutés 5 mM	0,00	0,00	0,00
	0,30	0,01	0,48
	0,55	0,05	0,85
	0,98	0,21	1,32
	1,34	0,47	1,48
	1,67	0,70	1,66
	2,19	1,13	1,80
	2,57	1,52	1,77
	3,36	2,30	1,81
	3,80	2,70	1,86

	C_o (mM)	C_e (mM)	Q (μmol/m²)
Phosphates ajoutés 10 mM	0,00	0,00	0,00
	0,30	0,04	0,44
	0,56	0,08	0,81
	0,99	0,26	1,24
	1,49	0,65	1,44
	1,69	0,78	1,54
	2,20	1,19	1,71
	2,62	1,60	1,72
	2,90	1,85	1,79
	3,83	2,75	1,84

Tableau III-6: Données d'adsorption du risédronate par HA en milieu KCl (1mM) contenant du chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$; 0 - 0,2 mM): $T \sim 37^\circ\text{C}$ et force ionique $I \sim 2 \text{ mM}$.

	C_o (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)
Calcium ajouté 0,05 mM	0,00	0,00	0,00
	0,31	0,00	0,52
	0,56	0,02	0,91
	0,98	0,12	1,47
	1,35	0,36	1,68
	1,74	0,62	1,90
	2,20	1,03	1,98
	2,60	1,37	2,09
	2,92	1,67	2,11

	C_o (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)
Calcium ajouté 0,2 mM	0,00	0,00	0,00
	0,29	0,00	0,48
	0,55	0,01	0,92
	0,99	0,11	1,50
	1,37	0,36	1,71
	1,69	0,59	1,87
	2,20	1,05	1,95
	2,60	1,39	2,05
	2,91	1,67	2,11

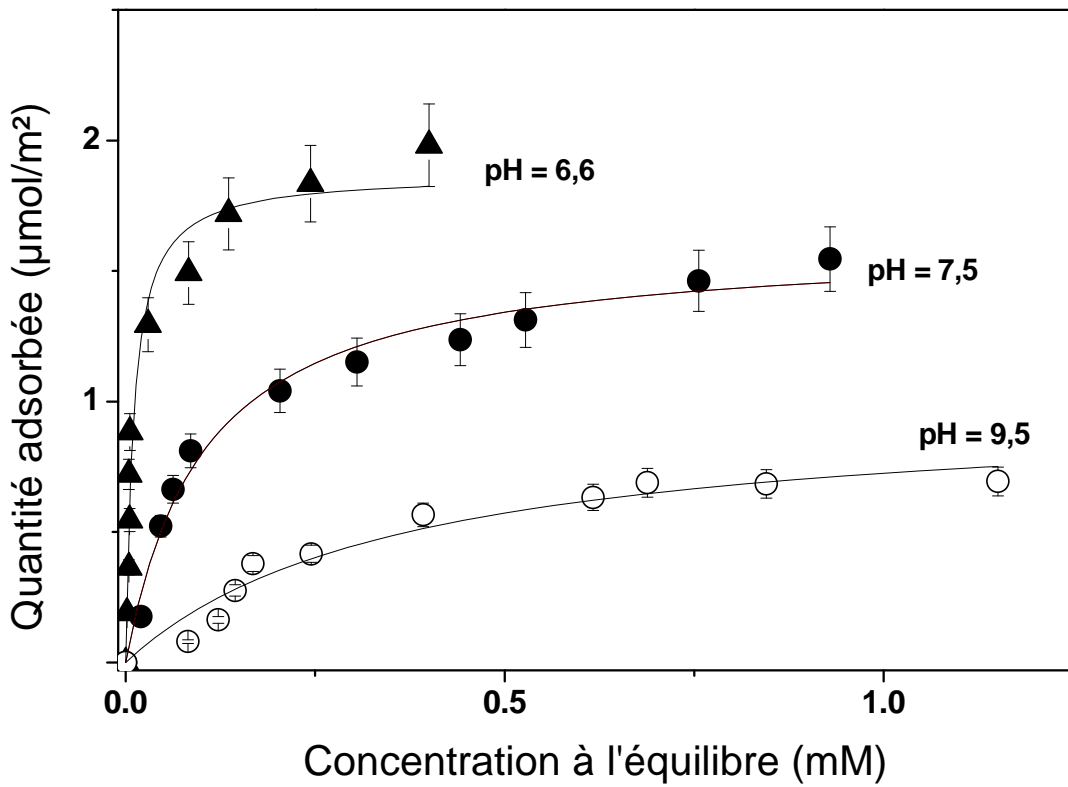


Figure III-6: Isothermes d'adsorption à 25°C du risédronate par HA à différents pH.

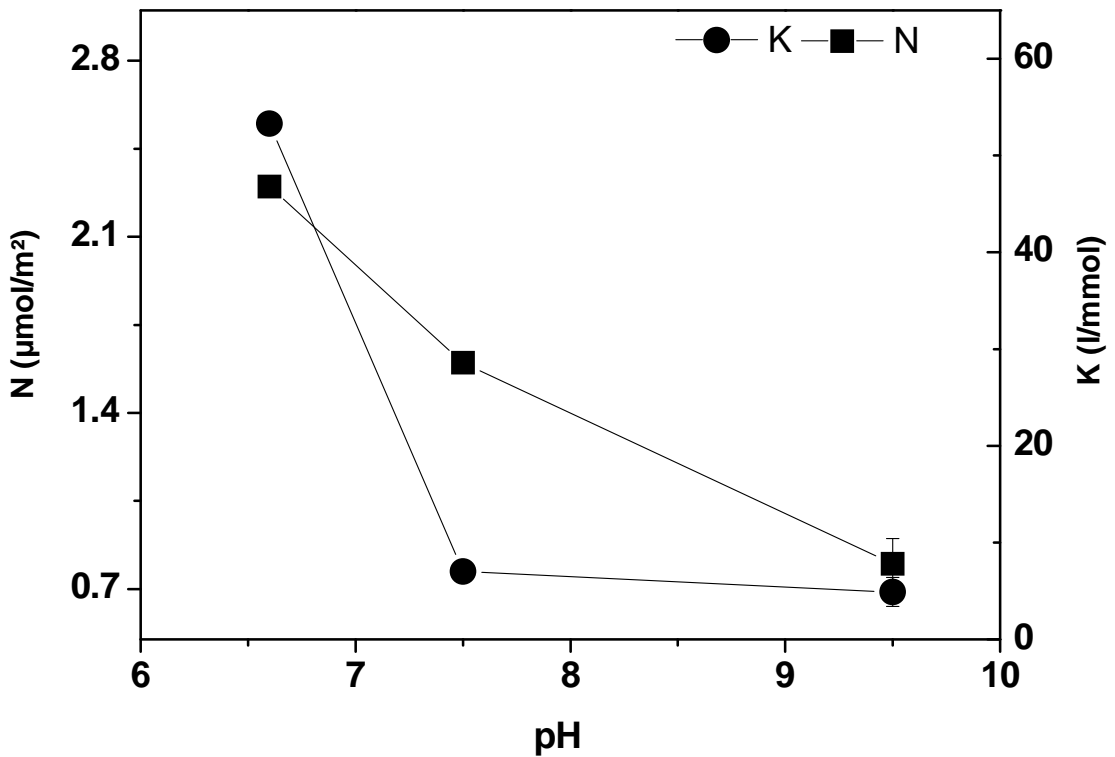


Figure III-7: Evolution des paramètres d'adsorption à 25°C du risédronate en fonction du pH du milieu.

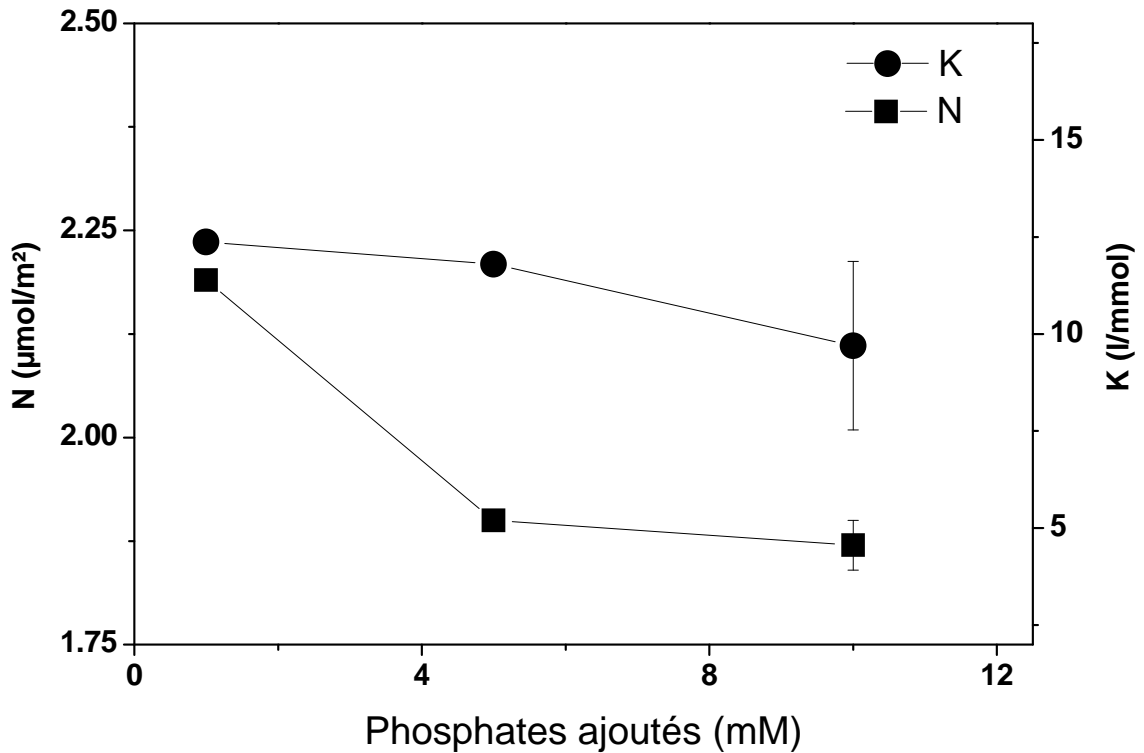


Figure III-8: Evolution des paramètres d'adsorption à $T \sim 37^{\circ}\text{C}$ du risédronate par HA en fonction de la quantité d'ions phosphate ajoutés.

II-2-5-3- Influence des ions calcium

Contrairement aux ions phosphate, la gamme de concentration explorée pour le calcium est relativement faible (0,05 - 0,2 mM), et ce afin d'éviter toute éventuelle précipitation de ces espèces en présence du risédronate. Les résultats d'adsorption obtenus sont consignés dans le tableau III-6.

L'ajout d'ions calcium semble affecter très peu les paramètres d'adsorption lorsque la concentration de ces espèces passe de 0,05 à 0,20 mM (Tableau III-7 (C)). On assiste à une légère augmentation de l'affinité apparente du risédronate pour la surface apatitique tandis que la quantité adsorbée à la saturation reste constante.

Tableau III-7 : Influence de la composition de la solution sur l'adsorption du risédronate par HA : quantité adsorbée à la saturation (N), constante d'affinité apparente (K) et surface occupée par molécule de risédronate adsorbée (δ).

A. Influence du pH : milieu KCl (1 mM) à T ~ 25°C				
pH _{initial} ($\pm 0,1$)	pH _{adsorption} ($\pm 0,1$)	N \pm Δ N ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	K \pm Δ K (L/mmol)	δ ($\text{nm}^2/\text{molecule}$)
4,8	6,6	2,1 \pm 0,1	53,3 \pm 15,7	0,7
7,2	7,5	1,7 \pm 0,1	7,6 \pm 1,2	1,0
11,0	9,5	0,8 \pm 0,1	4,9 \pm 1,0	2,1
B. Influence des ions phosphate : T ~ 37°C et force ionique I ~ 11 mM				
Phosphates ajoutés (mM)		N \pm Δ N ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	K \pm Δ K (L/mmol)	δ ($\text{nm}^2/\text{molécule}$)
1		2,19 \pm 0,05	12,4 \pm 4,2	0,8
5		1,90 \pm 0,02	11,8 \pm 2,2	0,9
10		1,87 \pm 0,03	9,7 \pm 2,2	0,9
C. Influence des ions calcium : T ~ 37°C et force ionique I ~ 2 mM				
Calcium ajouté (mM)		N \pm Δ N ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	K \pm Δ K (L/mmol)	δ ($\text{nm}^2/\text{molecule}$)
0,05		2,1 \pm 0,1	18,9 \pm 6,8	0,8
0,20		2,1 \pm 0,1	22,7 \pm 10,3	0,8

II-2-6- Influence de l'adsorption sur la composition du milieu

L'influence de l'adsorption sur la composition de la solution a été suivie en déterminant les teneurs en ions calcium, phosphate et hydroxyle en solution en fonction de la quantité de risédronate fixée à la surface du support. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III-8.

L'adsorption du risédronate par l'apatite dans la gamme de concentration examinée (0 - 5,7 mM) ne provoque pas de variation significative de pH (tout au plus une élévation de 0,1 à 0,3 unité). L'analyse chimique des solutions, quant à elle, révèle que la fixation des molécules de risédronate à la surface du support se traduit par une modification des teneurs en ions minéraux en solution. Ainsi, la comparaison des résultats obtenus avec le témoin (suspension sans adsorbat) indique que les ions phosphate libérés en solution lors de l'adsorption sont en quantité relativement importante, tandis que la teneur en ions calcium varie légèrement. La concentration en ions phosphate mise en solution augmente linéairement avec la quantité adsorbée; cependant, l'évolution de la teneur en ions calcium est non monotone. Cette corrélation entre les ions minéraux en solution et la quantité adsorbée est illustrée sur la figure III-9.

Par ailleurs, l'analyse des solutions d'adsorption par RMN ^{31}P confirme la libération des ions phosphate au cours du processus d'adsorption. Ainsi, en plus du multiplet centré vers 17,2 ppm qui est caractéristique du risédronate, on note la présence d'un pic intense situé à 2 ppm attribuable aux ions phosphate mis en solution lors de l'adsorption (Figure III-10).

Tableau III-8: Composition des solutions après adsorption en milieu chlorure de potassium (1mM) à T ~ 37°C.

C _o (mM)	C _e (mM)	Q (μmol/m ²)	P en solution (mM)	Ca en solution (mM)	pH _i - pH _{ads}
0	0	0	0,10	0,16	7,4 - 7,3
0,71	0,02	1,16	0,91	0,03	7,3 - 7,4
1,41	0,32	1,85	1,27	0,11	7,5 - 7,7
2,12	0,97	1,95	1,32	0,12	7,4 - 7,6
2,83	1,64	2,02	1,34	0,19	7,5 - 7,7
3,53	2,33	2,04	1,33	0,22	7,4 - 7,7
4,24	2,95	2,19	1,37	0,17	7,4 - 7,7
4,95	3,61	2,26	1,46	0,18	7,4 - 7,7
5,66	4,31	2,29	1,48	0,22	7,4 - 7,6

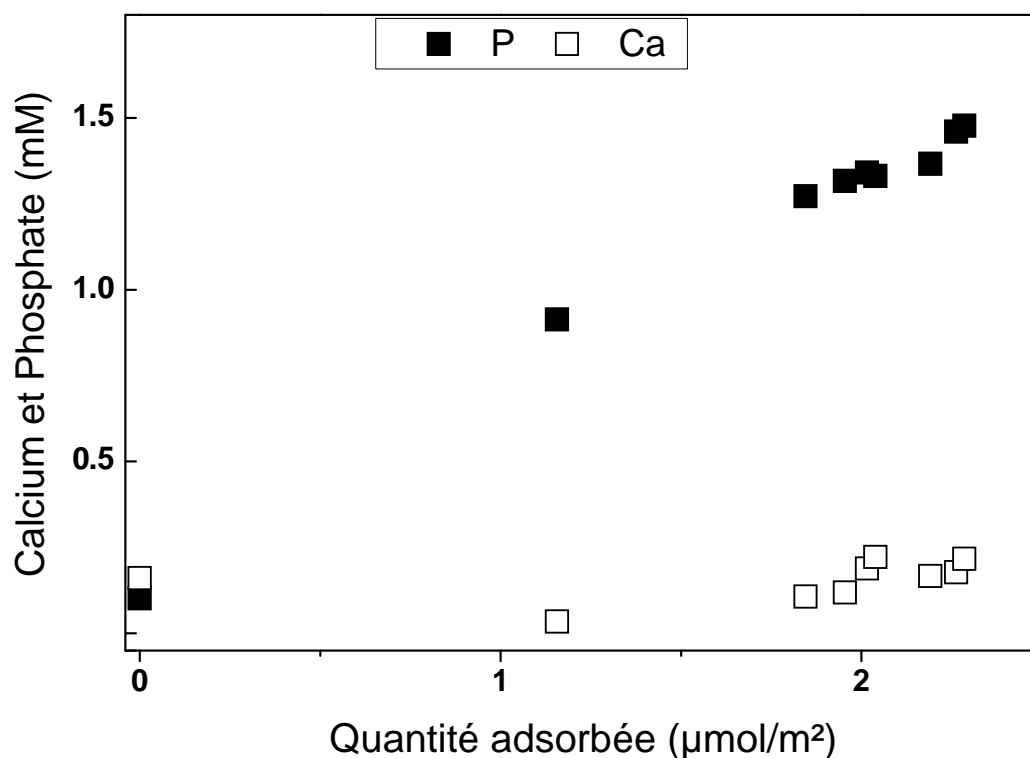


Figure III-9: Evolution de la teneur en ions minéraux mis en solution en fonction de la quantité de risédronate adsorbée: milieu KCl (1mM) à T ~ 37°C.

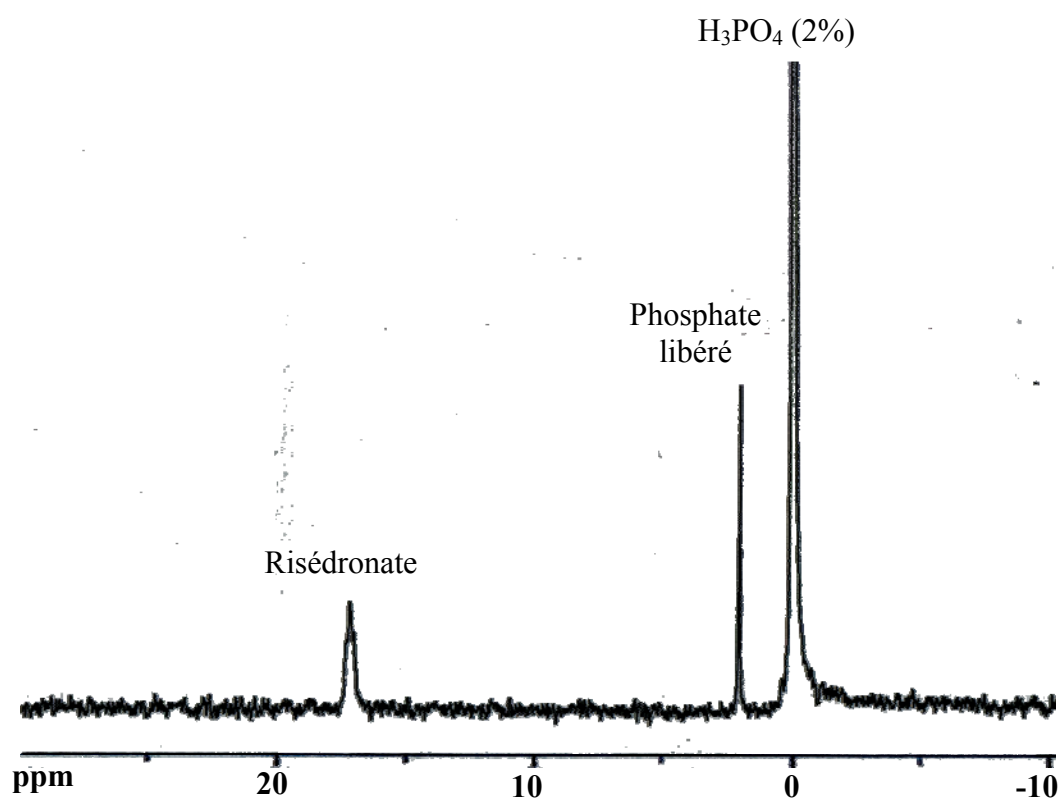


Figure III-10: Spectre RMN ^{31}P représentatif de filtrats obtenus après adsorption du risédronate en milieu KCl (1 mM): $\text{pH}_i \sim 7,4$ et $T \sim 37^\circ\text{C}$. Le pic de H_3PO_4 (2%) correspond à l'étalon externe.

II-2-7- Adsorption du risédronate à partir de solutions concentrées

L'étude d'adsorption du risédronate par HA a été étendue à une gamme de concentration allant jusqu'à 23 mM, et ce afin de mettre en évidence toute interaction réactive susceptible de se produire entre les ions minéraux et les espèces risédronate à la surface du minéral. Le protocole expérimental adopté est identique à celui utilisé pour la gamme de concentration initialement explorée (0 - 5,7 mM): 50 mg de solide dans 5 ml de solution d'adsorbat en milieu KCl (1 mM) de $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$ et à $T \sim 37^\circ\text{C}$.

Les données d'adsorption ainsi que les teneurs en ions minéraux dans les surnageants obtenus après adsorption sont consignés dans le tableau III-9. Ce dernier regroupe tous les résultats récoltés pour les deux gammes de concentrations examinées (0 à 23 mM) en vue d'une étude complète des phénomènes physico-chimiques intervenant à la surface du minéral.

II-2-7-1- Isotherme d'adsorption

L'évolution de la quantité de risédronate adsorbée par HA en fonction de sa concentration résiduelle à l'équilibre dans toute la gamme de concentration allant de 0 à 23 mM est reportée sur la figure III-11. L'allure de la courbe obtenue met en évidence deux étapes distinctes selon la concentration en adsorbat. Dans le premier domaine ($C_e < 10$ mM), l'évolution de la quantité de risédronate adsorbée montre un pallier au niveau de la saturation, bien défini et atteint dès les faibles concentrations; ce domaine a fait l'objet de l'étude détaillée décrite dans le paragraphe II-2-2. Dans la seconde zone ($C_e \geq 10$ mM), l'isotherme change d'allure et la quantité adsorbée croît à nouveau après le plateau, en fonction de la quantité de risédronate en solution à l'équilibre. La présence de cette marche traduit l'existence d'un autre mode d'interaction à la surface du matériau qui se manifeste dans le domaine de grandes concentrations.

Tableau III-9: Données d'adsorption à $T \sim 37^{\circ}\text{C}$ du risédronate par HA dans toute la gamme de concentration explorée (0 - 23 mM) : milieu KCl (1 mM) de $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$.

	C_o (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	P (mM)	Ca (mM)
Domaine I	0,00	0,00	0,00	0,10	0,16
	0,25	0,02	0,38	-	-
	0,52	0,03	0,84	-	-
	0,67	0,05	1,08	-	-
	0,71	0,02	1,16	0,91	0,03
	0,82	0,07	1,27	-	-
	1,03	0,16	1,48	-	-
	1,41	0,32	1,85	1,27	0,11
	2,12	0,97	1,95	1,32	0,12
	2,83	1,64	2,02	1,34	0,19
	3,53	2,30	2,04	1,33	0,22
	4,24	2,95	2,19	1,37	0,17
	4,95	3,61	2,26	1,46	0,18
	5,66	4,31	2,29	1,48	0,22
	10,38	8,65	2,39	-	-
	11,59	9,86	2,41	-	-
Domaine II	14,90	12,58	3,92	1,48	0,55
	17,83	15,23	4,42	1,51	0,62
	20,06	17,58	4,20	1,54	0,66
	22,95	20,11	4,83	1,56	0,70

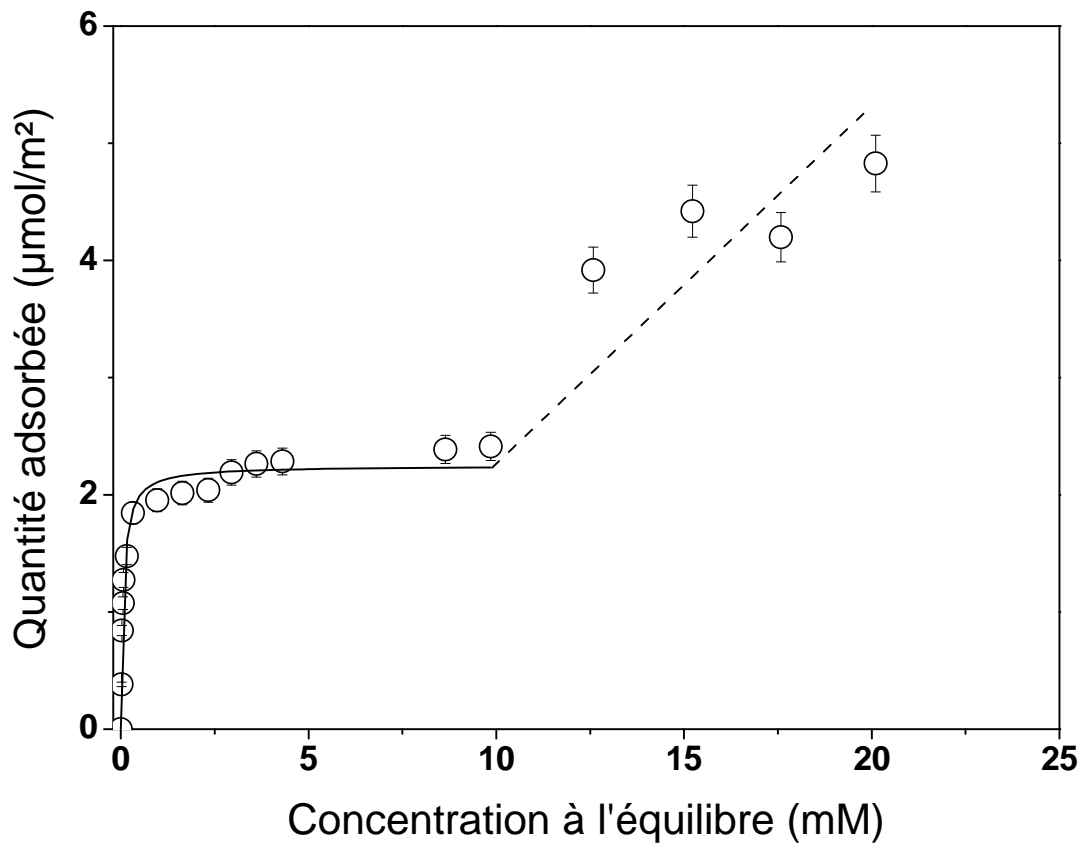


Figure III-11: Isotherme d'adsorption à $T \sim 37^\circ\text{C}$ du risédronate par HA dans la gamme de concentration (0 à 23 mM): milieu KCl (1 mM) de $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$.

II-2-7-2- Influence de l'adsorption sur la composition du milieu.

Les résultats de l'analyse chimique des surnageants récoltés après adsorption pour toute la gamme de concentration examinée sont regroupés dans tableau III-9. La corrélation entre les ions minéraux en solution et la quantité adsorbée est illustrée sur la figure III-12.

Un premier examen des résultats obtenus montre que les quantités en ions phosphate mises en solution sont relativement importantes comparées aux ions calcium. Lorsque la quantité fixée à la surface du minéral devient relativement importante, l'évolution des espèces calcium et phosphate en solution diffère de celle notée pour les faibles concentrations.

L'analyse globale des teneurs en ions phosphate en solution révèle qu'après l'évolution graduelle relative au domaine de faibles concentrations, la mise en solution de ces espèces devient moins importante et semble se stabiliser lorsque la quantité adsorbée est assez importante. Cependant, on assiste à une libération ascendante des ions calcium. Ces observations suggèrent que les phénomènes physicochimiques qui interviennent à la surface du matériau sont plus complexes qu'un simple processus d'échange tel décrit dans le domaine des concentrations relativement faibles.

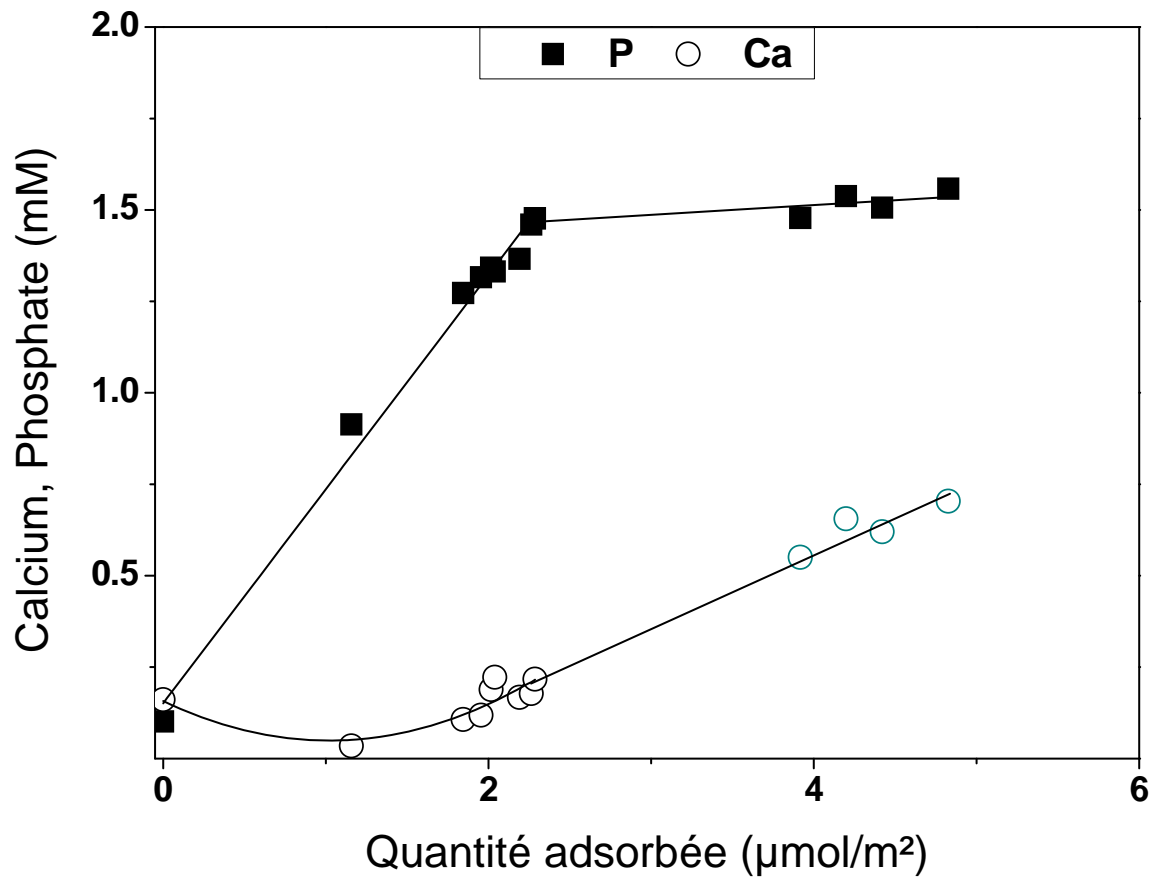


Figure III-12: Evolution des teneurs en ions phosphate et calcium en solution en fonction de la quantité de risédronate adsorbée : milieu KCl (1 mM), $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$ et $T \sim 37^\circ\text{C}$.

II-3- Caractérisation du support après adsorption

L'analyse chimique des solutions d'adsorption tout au long des expériences permet de déterminer la nature et les quantités des espèces échangées entre la solution et les particules solides de l'apatite. Toutefois, même si ces mesures sont nécessaires, elles ne sont pas suffisantes pour en déduire le mécanisme de fixation du risédronate par le support HA.

Pour mieux comprendre l'évolution du système, déceler toute modification structurale et examiner les altérations morphologiques des solides, les résultats précédents issus des expériences de fixation doivent être associés à la caractérisation physico-chimique des poudres. Pour cela, les solides récupérés après contact avec les molécules de risédronate ont fait l'objet de caractérisation moyennant différentes techniques: diffraction des rayons X, spectroscopie d'absorption infrarouge, spectroscopie de diffusion Raman, résonance magnétique nucléaire de l'état solide, microscopie électronique à balayage et analyses chimiques.

II-3-1- Conditions expérimentales

Les échantillons ont été initialement mis en contact pendant 2 h en présence d'une solution de risédronate de concentration désirée ($\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$ et $T \sim 37^\circ\text{C}$). Après centrifugation et filtration (0,4 mm), les poudres obtenues ont été lavées avec des solutions de KCl (1 mM ; $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$) puis lyophilisées pendant 24 h. Des suspensions de même rapport solide/solution mais sans adsorbat ont été traitées dans des conditions similaires aux tests d'adsorption afin de servir de témoins.

II-3-2- Résultats

II-3-2-1- Diffraction des rayons X

Les spectres de DRX des solides obtenus après adsorption ne montrent aucune différence par rapport à celui de l'apatite non traitée. Aucune phase étrangère autre que l'apatite n'a été observée. Les dimensions apparentes des cristallites des échantillons examinés, estimées à partir de la formule de Scherrer, ne font pas l'objet de modification significative (Tableau III-10): il s'agit toujours de cristallites de forme allongée et de taille comparable à celle de l'apatite de référence.

Tableau III-10: Dimensions apparentes des cristaux de HA après traitement dans une solution 2 mM de risédronate (HA/BP) et dans une solution 1mM de KCl (HA/KCl).

	HA (Référence)	HA/KCl (Témoin)	HA/BP
$L_{(310)} (\pm 0,5 \text{ nm})$	27,5	28,2	27,8
$L_{(002)} (\pm 0,5 \text{ nm})$	57,4	56,8	58,2

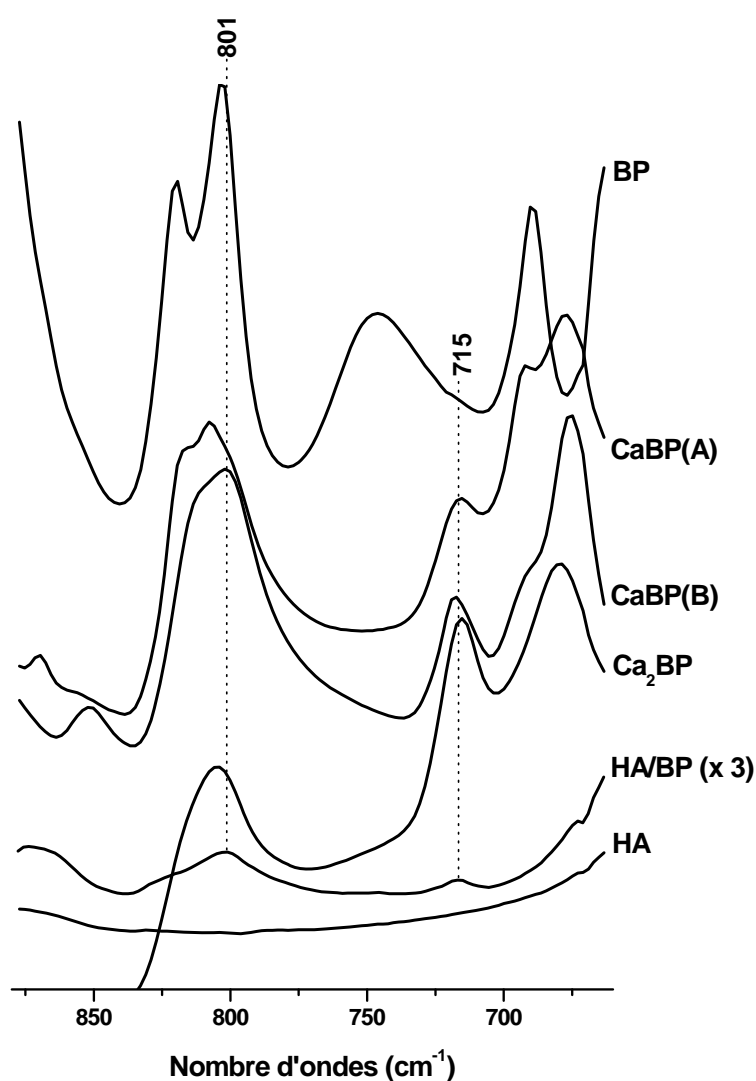


Figure III-13: Spectres infrarouge de l'apatite avant (HA) et après adsorption du risédronate (HA/BP), des sels de risédronate de calcium et du risédronate monosodique seul (BP).

II-3-2-2- Spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier (IRTF)

La figure III-13 montre les spectres d'absorption IR dans le domaine 650-900 cm^{-1} pour l'apatite HA avant et après contact avec les molécules de risédronate dans un milieu KCl (1 mM). Pour toute éventuelle comparaison, nous avons également reporté sur cette figure le spectre de la molécule native ainsi que ceux des sels de risédronate de calcium susceptibles de se former dans les conditions examinées: CaBP(A), CaBP(B) et Ca₂BP (voir chapitre II, partie B).

Le spectre de HA obtenue après adsorption (HA/BP) fait apparaître deux bandes larges de faibles intensités situées vers 715 et 801 cm^{-1} , attribuables aux modes de vibration des liaisons C-P dans les molécules de risédronate. Des bandes similaires, mais d'intensité plus importante, figurent également sur les spectres des sels de risédronate de calcium précipités. Le spectre de la molécule native quant à lui fait apparaître une bande très intense vers 800 cm^{-1} qui coïncide avec celle notée pour le support après adsorption; on observe également deux autres bandes dont les positions (747 et 690 cm^{-1}) diffèrent de celle vers 715 cm^{-1} du support après adsorption.

II-3-2-3- Spectrométrie par diffusion Raman

Le spectre Raman de l'échantillon HA après interaction avec le bisphosphonate étudié révèle la présence de bandes de vibrations supplémentaires autres que celles observées dans le support non traité (Figure III-14 (a)). Ces bandes présentent des similitudes avec celles notées sur les spectres des sels de calcium préparés et leurs positions sont légèrement déplacées par rapport au spectre de la molécule libre. Ces observations sont nettement mises en évidence sur les spectres obtenus après accumulation dans les domaines de vibration du noyau pyridine et des groupements fonctionnels de la molécule de risédronate (Figure III-14 (b), (c) et (d)).

L'examen dans la région spectrale située entre 550 et 750 cm^{-1} (Figure III-14 (b)) indique que les positions des bandes de vibration caractéristiques des liaisons C-P sur le spectre de HA/BP sont déplacées vers les nombres d'ondes élevés ($\Delta\nu = 12 \text{ cm}^{-1}$), comparé à la molécule native. Cette observation suggère l'existence d'interaction notable impliquant les molécules de risédronate et la surface du support. Il est à noter que ces bandes figurent également dans les spectres des sels de calcium préparés mais sont plus intenses.

Le domaine de vibration situé entre 1150 et 1500 cm^{-1} du spectre de HA/BP (Figure III-14 (c)), quant à lui, montre une bande assez intense vers 1319 cm^{-1} caractéristique du mode de déformation dans le plan des liaisons C-H du groupement pyridine de la molécule de risédronate. On note également une bande large et de faible intensité (1445 cm^{-1}) attribuée aux modes de vibrations des liaisons C-C et C-N du

noyau pyridine ainsi qu'une bande de vibration des liaisons P=O (1227 cm^{-1}). Ces bandes, légèrement déplacées par rapport à la molécule native, sont similaires à celles observées sur le spectre du sel de calcium préparé Ca_2BP .

Par ailleurs, le domaine de vibration $1520 - 1680\text{ cm}^{-1}$ (Figure III-14 (d)) met en évidence un doublet avec une bande assez intense (1596 cm^{-1}) et une autre bande de faible intensité (1582 cm^{-1}), assignés aux vibrations de la pyridine; ce doublet est superposable à celui noté dans les sels de calcium de risédronate préparés, en particulier le sel Ca_2BP . Les sels CaBP (A et B) montrent à la fois les bandes du spectre du risédronate monosodique seul (bande intense apparaît vers 1640 cm^{-1} , l'épaule vers 1627 cm^{-1} et un pic moins intense à 1570 cm^{-1}) et du sel Ca_2BP .

II-3-2-4- Spectroscopie RMN de l'état solide

Le spectre $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP MAS de l'échantillon HA après adsorption présente (Figure III-15) un pic situé à 3 ppm relatif aux phosphates apatitiques ainsi qu'un massif large vers 18 ppm. Ce massif apparaît dans le domaine où la molécule de risédronate présente deux raies fines et intenses (19,0 ppm et 17,1 ppm) caractéristiques des noyaux du phosphore. La présence de ce massif traduit la présence d'une forme dérivée du bisphosphonate étudié à la surface du support. Sur la base des spectres RMN des sels de risédronate de calcium synthétisés (chapitre II, partie B), seul le composé Ca_2BP présente dans le même domaine un signal identique au massif noté pour HA/BP mais d'intensité plus importante.

La comparaison des spectres RMN du proton ^1H obtenus en impulsion unique et rotation à l'angle magique, réalisés sur les supports avant (HA) et après traitement (HA/BP), atteste également de la présence de risédronate à la surface de l'apatite examinée (Figure III-16). Le spectre RMN ^1H SPE-MAS du risédronate monosodique montre quatre pics larges de faible intensité situés respectivement vers 5,2, 7,2, 13,8 et 16,4 ppm. Les pics larges vers 5,2 et 7,2 peuvent être attribués à l'eau de structure et/ou adsorbée, tandis que les pics situés à 13,8 et 16,4 ppm sont caractéristiques des protons des groupements phosphonate de la molécule de risédronate.

Sur le spectre de l'apatite après adsorption on assiste à l'apparition de deux signaux de faible intensité vers 3,6 ppm et 8,2 ppm qui ne figuraient pas sur le spectre du support HA. Le pic situé à 8,5 ppm est déplacé par rapport à celui noté sur le spectre de la molécule libre, mais similaire à celui signalé sur le spectre du sel Ca_2BP . La raie vers 3,6 ppm quant à elle reste difficile à attribuer. On note également l'élargissement significatif de la raie associée aux molécules d'eau situées à 5,5 ppm qu'on retrouve aussi bien sur le spectre de HA que sur celui du précipité Ca_2BP .

II-3-2-5- Analyse chimique

L'influence de la quantité de risédronate adsorbée sur le rapport atomique Ca/P du solide HA a été examinée à pH 7,4 et $T \sim 37^{\circ}\text{C}$. La concentration initiale utilisée en adsorbat est de 1,73 mM et la quantité correspondante retenue au plateau de saturation de l'isotherme vaut $1,83 \mu\text{mol}/\text{m}^2$.

Le rapport atomique entre ions calcium et phosphate inorganique (Ca/P) du précipité HA est similaire à celui du témoin (HA/KCl) (Tableau III-11). Cependant, une légère augmentation se manifeste pour le solide traité en présence du risédronate (HA/BP). Cette évolution pourrait être liée à la libération d'ions phosphate, suite aux échanges ioniques avec les molécules de risédronate. Ceci est compatible avec le rapport atomique Ca/(P+BP) qui reste similaire à celui du témoin.

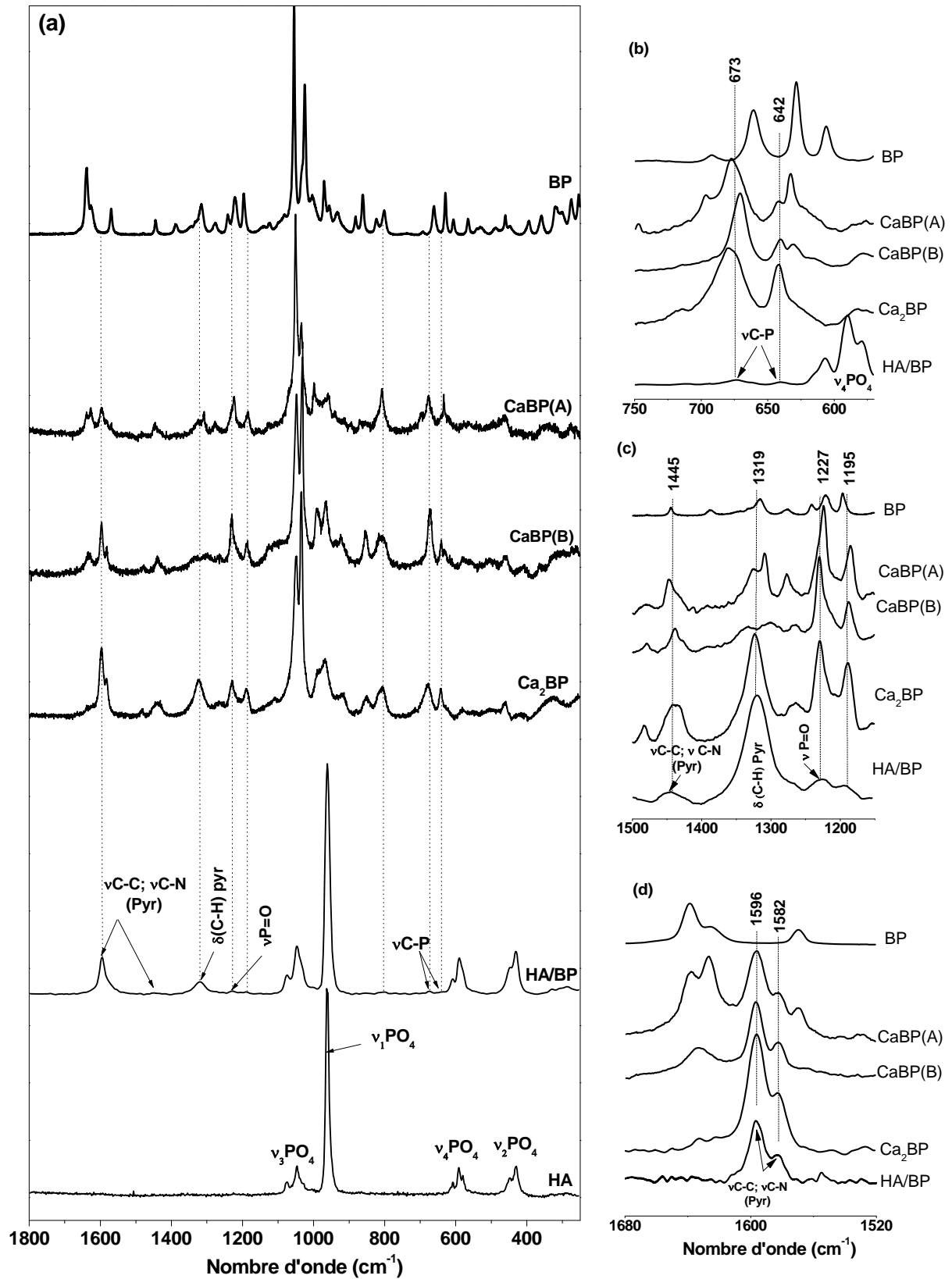


Figure III-14: Spectres de diffusion Raman de HA avant et après adsorption :
 (a): domaine 200 - 1800 cm^{-1} ; (b): domaine 550 - 750 cm^{-1} ;
 (c): domaine 1150 - 1500 cm^{-1} ; (d): domaine 1520 - 1680 cm^{-1} .

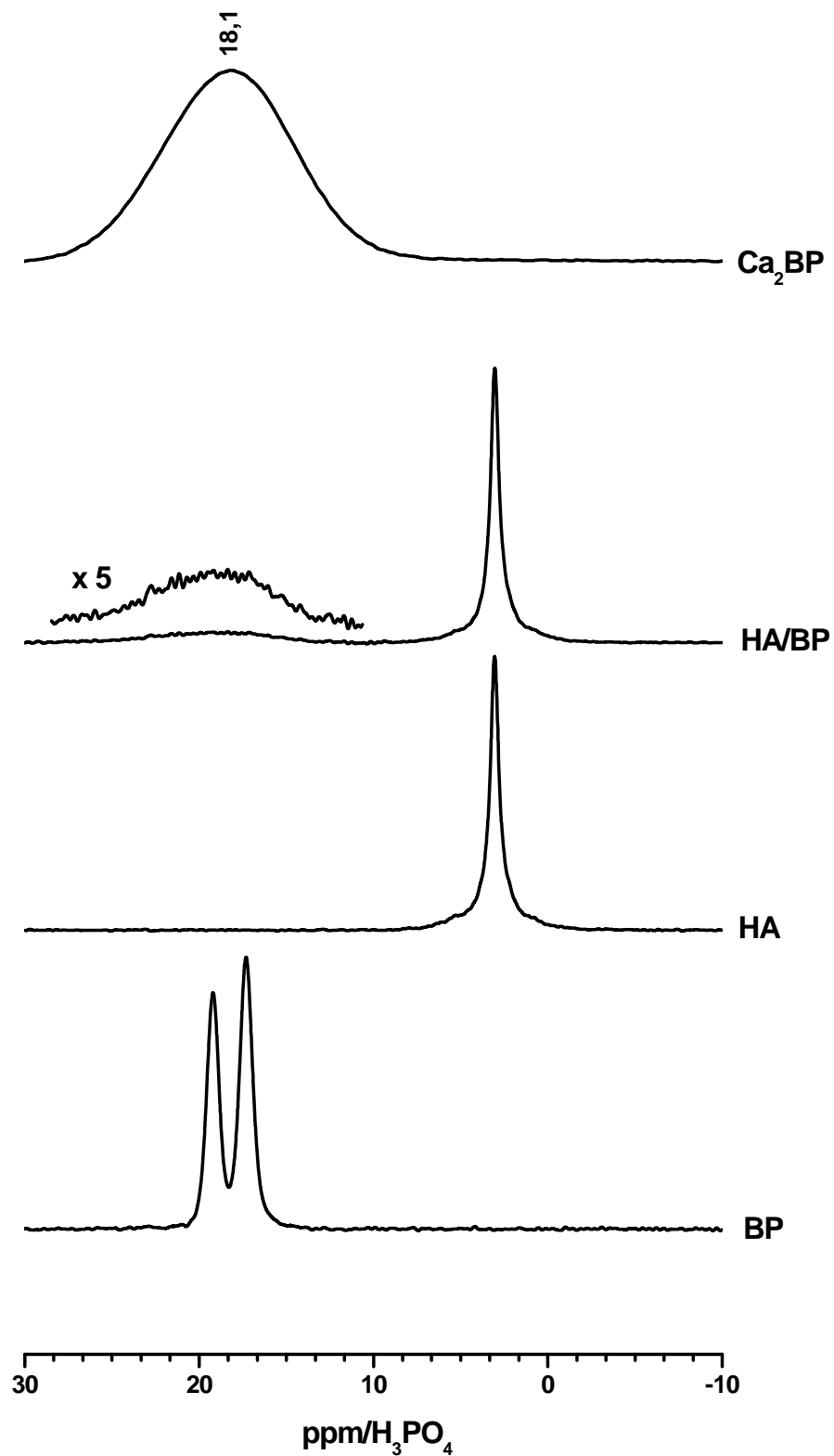


Figure III-15: Spectres RMN $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP MAS de risédronate (BP), de l'apatite avant (HA) et après adsorption (HA/BP) et du risédronate de calcium (Ca_2BP).

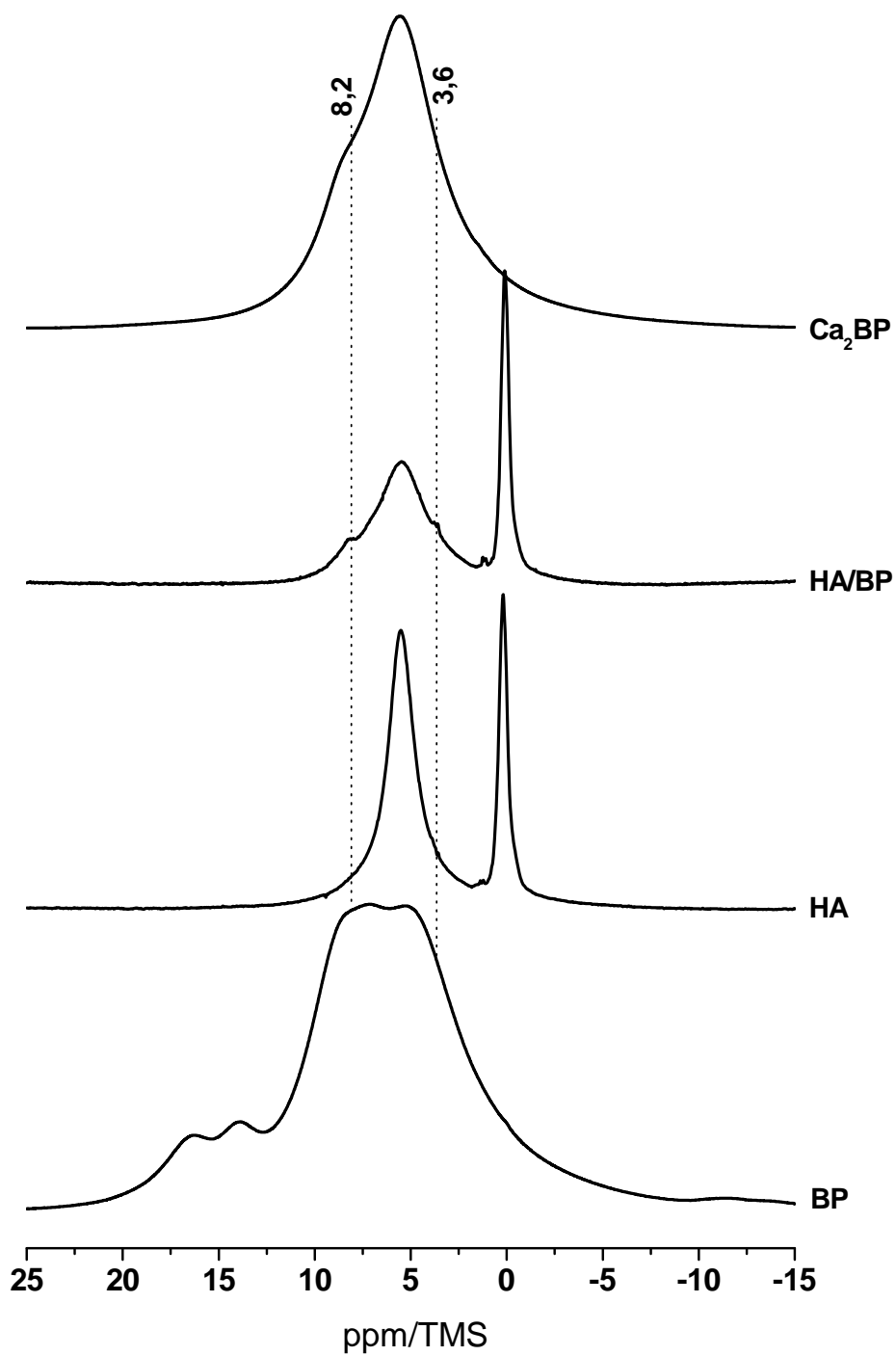


Figure III-16: Spectres RMN ^1H SPE-MAS du risédronate (BP), de l'apatite avant (HA) et après adsorption (HA/BP) et du risédronate de calcium (Ca_2BP).

Tableau III-11: Analyse chimique de HA traité en milieu KCl 1 mM (HA/KCl) et dans le même milieu contenant 1,73 mM de risédronate (HA/BP).

	BP (%) (± 0,5%)	Ca (%) (± 0,5%)	P (%) (± 0,5%)	Ca/P (± 1%)	Ca/(P+BP) (± 2%)
HA	-	37,20	17,57	1,64	-
HA/KCl	-	35,80	16,87	1,64	-
HA/BP	3,79	35,30	16,32	1,68	1,64

III- DISCUSSION

L'adsorption des molécules de risédronate par le support HA dans les conditions examinées se fait selon une cinétique rapide. L'équilibre est atteint après environ 20 min d'incubation. Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature pour l'interaction de phosphates apatitiques avec différents bisphosphonates (Roussière et al., 2005; Nancollas et al., 2006), avec la phosphoserine (Benaziz et al., 2001) et avec les phosphocitrates (Johnson et al., 1991). Des cinétiques rapides ont également été obtenues pour l'adsorption de molécules présentant différents groupements fonctionnels par des phosphates de calcium apatitiques (Barroug et al., 1989; Ouizat et al., 1999). Ceci témoigne de la grande réactivité de la surface des cristaux apatitiques vis-à-vis de molécules d'intérêt biologique.

Les isothermes de fixation du risédronate à la surface de HA à partir de solutions diluées sont de type Langmuir. Le plateau de saturation est généralement atteint pour des faibles concentrations en adsorbat, traduisant la grande réactivité de la surface du matériau vis-à-vis de ces espèces. Des allures similaires ont été rapportées dans la littérature (Claessens et Kolar, 2000; Vitha et al., 2008; Mukherjee et al., 2008) pour l'interaction de HA avec divers bisphosphonates (zolédronate, alendronate, ibandronate, étidronate, et clodronate). Par ailleurs, l'isotherme d'adsorption du zolédronate par HA à 37°C dans une gamme de concentration relativement élevée (10 à 50 mM) montre aussi un plateau de saturation bien défini, caractéristique d'une allure de type Langmuir, tandis que les auteurs Josse et al., 2005 l'attribuent à la loi de Freundlich.

La comparaison des paramètres d'adsorption déduits de l'équation de Langmuir montre que l'augmentation de la température d'incubation de 25 à 37°C se traduit par une élévation de presque 35% de la capacité d'adsorption du minéral apatitique. Ces observations indiquent que la densité superficielle des sites d'adsorption augmente avec la température. Cela peut être probablement dû aux phénomènes de déshydratation des molécules d'adsorbats et de la surface de l'apatite. Des résultats similaires sont rapportés dans la littérature pour l'interaction de HA avec des complexes de terbium (Rill et al., 2009) utilisés comme marqueurs de l'os tels le DOTP (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetra(méthylénephosphonic acid)), et le BPPED (10-((diphosphonoethyl(hydroxy)phosphoryl)méthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-tri(acetic acid)), les complexes de lanthanide de bisphosphonates (Alves et al., 2003), les pyrophosphates (Jung et al., 1973), l'albumine de sérum bovin (Yin et al., 2002), et le cisplatine (Barroug et al., 2004).

L'évaluation du rôle des ions déterminant de la charge de surface (ions calcium, phosphate et hydronium) sur la fixation des molécules d'adsorbat, d'une part, et la

connaissance de la composition des surnageants ainsi que l'état de surface des cristaux obtenus après adsorption, d'autre part, permettent de préciser l'aspect physico-chimique de l'interaction adsorbant-adsorbat. Les résultats obtenus dans les diverses conditions expérimentales examinées (composition de solution et concentration en adsorbat variables) révèlent que la surface du minéral est le siège de processus réactifs impliquant les ions minéraux du support et les molécules d'adsorbat (échange ionique et/ou réactions chimiques...).

La modification de la teneur en ions actifs en solution affecte considérablement le processus d'adsorption. La diminution des paramètres d'adsorption lors de l'élévation du pH du milieu pourrait être la conséquence directe de l'évolution du degré d'ionisation des groupements fonctionnels à la surface des cristaux et des molécules d'adsorbat. La présence d'ions phosphate dans le milieu inhibe la fixation des espèces risédronate, suite à leur compétition pour les sites actifs à la surface du minéral; cependant on assiste à une élévation de l'affinité apparente lorsque les ions calcium sont présents dans le milieu. Des tendances similaires ont été rapportées dans la littérature pour l'interaction de HA avec des protéines acides (Barroug et al., 1998; Shimabayashi et al., 1991, Kondori et al., 1992; Ouizat, 2000), des acides aminés (Moreno et al., 1984, Benaziz, 2002), des citrates et phosphocitrates (Johnson et al., 1991; López-Macipe et al., 1998). Le mode d'interaction des espèces anioniques et cationiques est généralement discuté, sur la base de données électrocinétiques, en terme de forces électrostatiques attractives ou répulsives selon la nature des espèces examinées et les conditions du milieu.

Cependant peu d'études systématiques ont été engagées sur la modification de la composition du milieu suite à l'adsorption (Rawls et al., 1982; Barroug et al., 1989, 1998; Misra, 1996); en outre l'évolution de la teneur en ions minéraux a rarement été reliée à la quantité adsorbée à la surface du minéral. Afin d'acquérir une meilleure connaissance du mécanisme qui gouverne le processus d'adsorption, nous avons procédé à l'analyse détaillée des surnageants recueillis après incubation. Les résultats obtenus indiquent que la rétention des molécules de risédronate affecte considérablement la teneur des espèces cationiques et anioniques présentes dans les solutions. Ainsi, la quantité d'ions phosphate mise en solution est proportionnelle à la quantité en bisphosphonate fixée à la surface du support. Cette observation traduit l'existence d'un processus d'échange entre les molécules d'adsorbats de la solution et les ions phosphate de la surface du minéral apatitique. Des phénomènes semblables ont été notés lors de la fixation de zolédronate (Josse, 2003; Roussière et al., 2005), de polyphosphonates (Rawls et Cabasso, 1984), de phosphoserine (Tanaka., 1991; Misra, 1997, Benaziz, 2002), de citrates (Misra, 1996), et de protéines à caractère acide (Barroug et al., 2008) à la surface du support apatitique.

D'autres phénomènes sont aussi à prendre en considération pour expliquer l'évolution de la teneur des ions minéraux en solution, notamment l'équilibre de dissolution de l'apatite et la formation de paires d'ions et/ou de sels de calcium solubles en solution.

L'analyse des surnageants des suspensions d'adsorption dans les conditions standards (Tableau III-12) indique qu'en absence des molécules d'adsorbat, la dissolution de HA est congruente; ainsi le rapport Ca/P du solide ($\text{Ca/P} = 1,64 \pm 0,02$) et assez proche de celui de la solution ($\text{Ca/P} = 1,60 \pm 0,02$). Ceci est généralement le cas lorsque l'échantillon est homogène ou lorsque les altérations de composition de surface des cristaux sont négligées (Dorozhkin, 2002); la pureté minéralogique du support utilisé ainsi que les conditions expérimentales adoptées (faible rapport solide/liquide et pH d'adsorption proche du point de charge nulle de l'apatite) confirment cette hypothèse.

Table III-12: Données d'adsorption du risédronate monosodique par HA dans un milieu KCl 1mM rapportées aux conditions standards (T = 37°C; pH_{adsorption} 7,7; rapport solide-solution 50 mg/5 mL): corrélation entre processus adsorption - dissolution de l'apatite.

Q ^a ($\mu\text{mol}/5\text{mL}$)	P libéré ^b ($\mu\text{mol}/5\text{mL}$)	Ca libéré ^c ($\mu\text{mol}/5\text{mL}$)	P associé au ^d Ca ^a ($\mu\text{mol}/5\text{mL}$)	P déplacé par BP ^(b-d) ($\mu\text{mol}/5\text{mL}$)	(P/BP) (b-d)/a
0	0,51	0,81	-	-	-
3,41	4,57	0,22	0,14	4,43	1,30
5,44	6,36	0,69	0,42	5,94	1,09
5,76	6,58	0,77	0,47	6,12	1,06
5,94	6,71	1,22	0,74	5,97	1,00
6,01	6,66	1,43	0,87	5,79	0,96
6,46	6,83	1,08	0,66	6,19	0,96
6,68	7,30	1,17	0,71	6,60	0,99
6,74	7,39	1,40	0,85	6,54	0,97

a Quantité de BP adsorbé dans 5 mL

b Quantité de phosphate libéré dans 5 mL

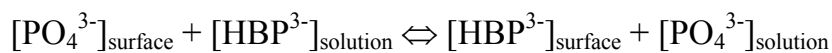
c Quantité de calcium libéré dans 5 mL

(b-d) Quantité de phosphate libéré par dissolution supposée congruente (Ca/P = 1,64)

(b-d/a) Rapport entre phosphate déplacé et BP adsorbé.

En présence des molécules de risédronate, la quantité en ions phosphate issue de la dissolution de l'apatite peut être estimée à partir des teneurs en calcium présentes en solution (Tableau III-12), et ce en considérant que la dissolution de l'apatite reste congruente au cours de l'adsorption. Cependant, la quantité d'ions phosphate déplacés par les molécules d'adsorbats peut être calculée pour tous les points de l'isotherme, ce qui permet de déduire le rapport entre phosphates libérés (P) et risédronates adsorbés (BP). Les résultats obtenus (Tableau III-12) indiquent que ce rapport P/BP est proche de 1 pour la plupart des points de l'isotherme, excepté pour les faibles concentrations de risédronate (P/BP = 1,30). Cette anomalie pourrait être en partie due aux erreurs cumulatives dans ce domaine de concentrations, mais aussi probablement au changement du rapport entre ions minéraux en solution (Ca/P) suite à l'altération de l'équilibre de surface de l'apatite.

Néanmoins, il semble que l'adsorption de risédronate est décrite par un processus d'échange ionique entre les ions PO_4^{3-} de la surface de HA et les espèces risédronate en solution. Si l'on considère le diagramme de spéciation réalisé sur la base des constantes d'acidité du risédronate (Nancollas et al., 2006; Takami et al., 2003; Hounslow et al., 2008), les espèces ioniques présentes en solution à pH ~ 7,4 sont de type HBP^{3-} (80%) et H_2BP^{2-} (20%), où «BP» représente l'ion risédronate. En tenant compte de la forme ionique majoritaire (HBP^{3-}), la réaction d'adsorption peut être représentée par l'équation suivante:



L'hydrolyse des ions PO_4^{3-} ainsi libérés dans le milieu peut expliquer la légère augmentation du pH notée lors de l'adsorption (tout au plus 0,3 unité); afin de tenir compte de la ré-équilibration de la solution, cette diminution de la teneur en protons H^+ serait compensée par la déprotonation des espèces H_2BP^{2-} .

L'équilibre d'adsorption pourrait ainsi être réinterprété en considérant la réaction d'échange ionique proposée au lieu d'un simple processus d'adsorption de Langmuir ($Q = (\text{KNC}_e)/(1+\text{KC}_e)$). L'expression de la constante d'équilibre expérimentale (K_{ex}) donnant lieu à une telle réaction d'échange serait:

$$\text{K}_{\text{ex}} = \frac{\text{P}_{\text{sol}} \cdot \text{Q}}{\text{C}_e (\text{N} - \text{Q})}$$

où P_{sol} représente la concentration des ions phosphate dans les solutions d'adsorption, Q la quantité de risédronate adsorbée, N le nombre de sites d'adsorption et C_e la concentration à l'équilibre. L'expression de la quantité adsorbée qui en résulte s'écrit:

$$Q = \frac{N \cdot K_{ex} \cdot (C_e / P_{sol})}{(1 + K_{ex} \cdot (C_e / P_{sol}))}$$

La comparaison de cette relation avec l'équation initiale de Langmuir indique que la concentration en adsorbat à l'équilibre a été remplacée par le rapport C_e/P_{sol} et la constante d'affinité K par la constante de la réaction d'échange ionique (K_{ex}). La réaction d'adsorption se trouve ainsi liée à la teneur en ions phosphate en solution; la linéarisation de cette nouvelle équation permet de calculer les paramètres caractéristiques de l'adsorption. La comparaison des résultats obtenus (Tableau III-13) montre que le modèle proposé s'applique bien pour les observations expérimentales de notre étude. La valeur de la quantité adsorbée à la saturation N reste inchangée, tandis que la constante d'équilibre est légèrement différente.

L'identification de la réaction d'adsorption comme un équilibre d'échange ionique impliquant les ions phosphate permet d'expliquer l'irréversibilité apparente du processus notée dans notre travail. La dilution se traduit par une diminution des concentrations respectives des molécules d'adsorbat et des ions phosphate en solution (C_e et P_{sol}), et ce dans le même rapport. Dans ces conditions, l'équilibre d'adsorption reste inchangé et est par conséquent irréversible. Les mêmes arguments sont valables pour commenter la non réversibilité observée pour l'interaction de phosphates de calcium apatitique avec des protéines acides (Barroug et al., 2008; Ouizat, 2000), avec des acides aminés (Benaziz et al., 2002; Moreno et al., 1984) et des complexes de phosphonates (Rill et al., 2009).

Bien qu'aucune désorption significative n'ait lieu lorsque la dilution est faite avec des solutions de KCl pré-équilibrées en présence du solide (protocole adopté afin de minimiser la dissolution des cristaux apatitiques), l'inverse se produit lorsque les ions phosphate sont présents dans le milieu. En effet, on assiste à une libération progressive des molécules de risédronate initialement fixées à la surface du minéral en fonction de la teneur en ions phosphate ajoutés, en accord avec le mécanisme d'échange ionique proposé. Une tendance similaire a été notée pour l'interaction de HA avec le zolédronate (Roussière et al., 2005), les polyphosphonates (Rawls et Cabasso, 1984) et la phosphoserine (Barroug et al., 2008). L'aptitude des ions phosphate à déplacer les espèces adsorbées par les apatites a été attribuée à leur grande affinité pour la surface de HA. Cet effet de déplacement d'espèces adsorbées suite à l'ajout d'ions phosphate est généralement décrit comme une compétition pour l'occupation des sites d'adsorption à la surface du minéral. Ce phénomène est largement observé en chromatographie en phase liquide, et il est mis à profit pour la séparation et la purification de bisphosphonates (Lawson et al., 2006) et de macromolécules (Gorbunoff, 1984; Kawasaki, 1991).

Tableau III-13: Paramètres caractéristiques de l'adsorption du risédronate selon le modèle simple de Langmuir et de Langmuir-échange ionique.

	Equation linéarisée	R ² (%)	N ± ΔN (μmol/m ²)	K ± ΔK (L/mmol)
Langmuir	$\frac{C_e}{Q} = \frac{C_e}{N} + \frac{1}{KN}$	99,9	2,3 ± 0,1	7,3 ± 3,7
Langmuir-échange ionique	$\frac{C_e/P}{Q} = \frac{C_e/P}{N} + \frac{1}{KN}$	99,4	2,3 ± 0,1	9,7 ± 5,0

Par ailleurs, il a été rapporté que les dilutions successives et les opérations de re-suspension durant quelques jours, menées sur des cristaux de HA ayant adsorbé des macromolécules en présence de teneurs élevées en phosphates ajoutées (2 à 8 mM), ne se traduit par aucune libération significative. La non réversibilité du processus a été attribuée à un changement structurel des molécules d'adsorbat : c'est le cas de macromolécules de faible stabilité structurale où l'adsorption a lieu en présence de répulsions électrostatiques et influe sur les propriétés structurales de la protéine (perte d'activité enzymatique, modification de structure hélicoïdale (taux d'hélice)) (Barroug et al., 1989; Norde et Haynes, 1995); la déformation structurale des molécules adsorbées et leur éventuel étalement à la surface du support accroît le nombre de sites d'attaches et rend difficile leur libération.

Par ailleurs, l'évolution observée de la quantité des ions calcium mise en solution durant l'adsorption est assez différente de celle des ions phosphate. Les concentrations sont plus faibles et restent relativement stables avec l'ajout de risédronate en solution. Des observations similaires ont été rapportés pour l'interaction de HA avec des polyphosphonates (Rawls et al., 1982), de l'etidronate et du clodronate (Roberston et al., 1972; Jung et al., 1973), et de la phosphoserine (Tanaka et al., 1991).

Toutefois, une faible augmentation des ions calcium en solution est observée au niveau du plateau d'adsorption (recouvrement totale de la surface minérale de l'apatite) et donc aux fortes teneurs en phosphate. Cette observation reste difficile à interpréter sur la base de l'équilibre de dissolution de la phase apatitique. En fait, la teneur en ions calcium libre en solution est fortement liée à celle des ions phosphate par le produit de solubilité de l'apatite. Ainsi, l'équilibre de dissolution devrait

conduire à une diminution des ions calcium libre en solution à de fortes concentrations de phosphate et non pas l'inverse. L'explication la plus plausible de ce phénomène est la formation de complexes de calcium soluble ou de paires d'ions impliquant les molécules de risédronate.

L'association des différentes méthodes complémentaires (DRX, IRTF, Raman et RMN du solide) utilisées dans notre étude nous a permis une analyse détaillée et plus fine des modifications morphologiques et microstructurale de l'apatite après interaction avec les molécules de risédronate.

Bien que l'analyse par DRX des poudres issues des expériences de fixation ne révèle aucune phase étrangère autre que celles caractéristiques d'une phase apatitique, les résultats obtenus par spectroscopie infrarouge montrent la présence de molécules de risédronate à la surface du minéral apatitique. Ainsi, nous avons noté sur les spectres infrarouges des apatites obtenues après adsorption deux bandes de vibration supplémentaires de faibles intensités, attribuables aux modes de vibration des liaisons C-P de la molécule de risédronate. Des observations similaires ont été notées sur les spectres infrarouges d'une hydroxyapatite synthétisée en présence de molécules d'acide phenylphosphonique (El Hammari et al., 2006).

L'examen des spectres de diffusion Raman des échantillons obtenus après contact avec les solutions de bisphosphonate confirme la fixation de ces espèces à la surface de HA. En effet, on note l'apparition de plusieurs bandes caractéristiques de la molécule de risédronate et spécialement les bandes de vibration relatives aux groupements pyridine de BP. La position de ces bandes supplémentaires est déplacée par rapport à la molécule libre, traduisant l'existence d'interaction notable entre adsorbat et sites actifs de la surface du minéral apatitique. Cet effet est également remarqué lors de l'interaction des molécules de risédronate avec les ions calcium (voir chapitre II). De plus, une grande similitude a été notée entre les bandes supplémentaires apparues sur les spectres Raman de l'apatite obtenue après adsorption traité et celles des sels de risédronate de calcium préparés, en particulier le sel de calcium noté Ca_2BP . Ceci laisse penser que l'interaction des molécules d'adsorbat à la surface de l'apatite est comparable à celle observée pour les sels de calcium de risédronate. De ce fait, la possibilité de formation d'un complexe ou un sel insoluble de risédronate de calcium à la surface de l'apatite ne doit être écartée et doit être considérée comme une réaction compétitive de l'adsorption. De tels complexes ont été identifiés par spectroscopie de diffusion Raman à la surface de l'hydroxyapatite traitée par des solutions d'etidronate (Cukrowski et al., 2007). En effet, cette étude a mis en évidence deux types de complexes d'etidronate de calcium à la surface de l'apatite étudiée selon la gamme de concentration explorée. Cependant, il est à noter que ce

travail a été réalisée dans des conditions expérimentales (pH très acide et température ambiante) assez différentes de celles adoptées dans notre étude ($\text{pH}_{\text{Initial}} \sim 7,4$ et $T \sim 37^\circ\text{C}$).

L'examen des spectres RMN du phosphore (RMN ^{31}P MAS) des apatites obtenues après contact avec les solutions d'adsorption montre, en plus du pic spécifique au phosphore apatitique (3 ppm), un massif large situé vers 18 ppm attribué au phosphore des groupements fonctionnels du risédronate. Cette raie est large et est de très faible intensité, comparée aux deux pics fins et bien résolus (19 et 17 ppm) enregistrés sur le spectre de la molécule avant adsorption. Des résultats similaires ont été rapportés pour l'interaction des molécules de zolédronate avec des apatites phosphocalciques déficientes en calcium (Josse et al., 2005; Roussière et al., 2005). L'explication plausible proposée par ces auteurs est la précipitation d'un complexe de zolédronate à la surface de l'apatite étudiée. Par ailleurs, le pic large noté lors de la fixation de l'acide vinyl phosphonique par l'hydroxyapatite ainsi que le déplacement enregistré ($\Delta\delta \approx 5$ ppm) par rapport à la molécule libre d'acide phosphonique (Haque et al., 2007) ont été attribués aux liaisons chimiques que les groupements phosphonate sont susceptibles de former avec les ions calcium de la surface de l'apatite.

L'allure large de la raie observée par RMN du solide sur le spectre de l'apatite HA après adsorption du risédronate est analogue à celle du sel de calcium (Ca_2BP), dont l'état amorphe a été confirmé par DRX. L'observation d'un mauvais état de cristallinité des espèces adsorbées par l'hydroxyapatite a été aussi notée pour divers bisphosphonates (Grossman et al., 2000). L'interaction de l'acide risédronique avec l'os humain montre des tendances similaires (Mukherjee et al., 2008); les auteurs ont montré que la fixation des molécules de risédronate à pH acide se traduit, sur le spectre RMN de l'os après traitement, par l'apparition d'une raie de résonance supplémentaire (entre 15 et 16 ppm) comparable à celle du sel de risédronate de calcium nanocristallin: ceci a été attribué à la formation d'une nouvelle phase mal cristallisée à la surface du minéral osseux.

Sur la base de nos observations expérimentales, nous pouvons ainsi conclure que la fixation des molécules de risédronate à la surface de HA induit des changements notables de l'environnement électronique des noyaux de phosphore des groupements phosphonate de la molécule étudiée. Les sites calcium situés à la surface du minéral pourraient être le siège de la forte interaction des molécules de BP avec le support apatitique.

IV- CONCLUSION

La réactivité de l'hydroxyapatite, prototype minéral du tissu osseux, vis-à-vis des molécules de risédronate en milieu aqueux a été étudiée. La rétention du risédronate par HA se produit selon un processus rapide. De plus, l'allure des isothermes d'adsorption obtenues dans tous les cas est de type Langmuir.

L'interaction du matériau avec le risédronate est gouvernée par un processus d'échange ionique impliquant les groupements phosphonate de la molécule d'adsorbat et les ions phosphate à la surface de HA. La formation de paires d'ions et/ou de sels de calcium solubles en solution est également un phénomène qui intervient à l'interface entre risédronate et la surface du minéral apatitique.

L'examen de la réversibilité d'adsorption vis-à-vis de la dilution ainsi que les tests réalisés sur la libération du risédronate par HA montrent que le processus de fixation s'effectue d'une manière non-réversible.

L'étude menée sur les solides obtenus après adsorption confirme la fixation de molécules d'adsorbats à la surface de HA. En effet, différentes bandes et raies supplémentaires ont été observé sur les spectres des solides traités en présence de BP examinée. Ces bandes sont déplacées par rapport à la molécule native et s'apparentent à celles du précipité du calcium de risédronate Ca_2BP , attestant ainsi des fortes interactions mises en jeu entre groupements fonctionnelles du risédronate et sites calcium à la surface de l'apatite bien cristallisée (HA).

Chapitre IV

ADSORPTION DU RISEDRONATE MONOSODIQUE PAR LES APATITES DE BASSE CRISTALLINITE ET CONSEQUENCES BIOLOGIQUES

I- INTRODUCTION

Les phosphates de calcium apatitiques bien cristallisées, en particulier l'hydroxyapatite, ont fait l'objet de nombreuses études qui visaient à mieux appréhender les phénomènes d'adsorption/désorption se produisant à l'interface entre apatites biologiques et milieux physiologiques (Barroug, 1989; Shimabayashi et al., 1991; Misra, 1997; Ouizat, 2000; Benaziz, 2002; Al-Katan et al., 2010). Le choix de l'hydroxyapatite, considérée comme prototype structural du minéral osseux, résulte en fait de sa stabilité thermique et de sa faible solubilité. Cependant ces matériaux bien cristallisés restent très éloignés de la composition et la nature réelle du minéral des tissus calcifiés et de leurs propriétés (Rey, 1990). En effet, le minéral osseux est généralement décrit comme une apatite nanocristalline carbonatée d'une surface spécifique considérable ($\sim 200 \text{ m}^2/\text{g}$). Ces nanocristaux sont en outre dotés d'une couche hydratée très réactive et riche en ions labiles "environnements non apatitiques; ces facteurs gouvernent les processus de dissolution, de maturation et également les propriétés d'échange et d'adsorption de ces matériaux (Rey et al., 1989 a et 1989b; Hina, 1996; Cazalbou et al., 2004a).

Les études d'adsorption effectuées ces dernières années sur les apatites synthétiques mal cristallisées concernent principalement des protéines (Ouizat et al., 1999, des acides aminés (Benaziz et al., 2001), des facteurs de croissance (Midy et al., 2001) ou des agents anticancéreux (Barroug et al., 2004; Lebugle et al., 2002). Toutefois, les investigations engagées sur l'interaction des bisphosphonates vis-à-vis d'apatites nanocristallines ou sur le minéral osseux sont rares (Palazzo et al., 2007; Ong et al., 2008) et ne semblent fournir des données précises sur la nature physico-chimique du processus d'adsorption de ces molécules. Dans cette perspective, nous nous proposons d'étudier le processus d'adsorption du risédronate par des apatites nanocristallines biomimétiques. L'influence de la rétention des molécules de risédronate sur l'évolution des apatites a en outre été examinée.

II- ADSORPTION DU RISEDRONATE PAR LES APATITES NANOCRISTALLINES CARBONATEES

II-1- Matériaux et méthodes

Les adsorbants examinés dans cette partie sont des apatites nanocristallines carbonatées (ANC) analogues au minéral osseux; l'élaboration et la caractérisation de ces matériaux ont fait l'objet du deuxième chapitre. Il s'agit d'apatites de basse cristallinité obtenues à différents temps de maturation (ANC-1j, ANC-6j, et ANC-30j); elles sont riches en environnements non apatitiques, déficientes en calcium et leur surface spécifique couvre la gamme de 95 à 200 m²/g.

II-1-1- Adsorption

Le protocole expérimental d'adsorption que nous avons adopté est identique à celui décrit dans le chapitre II mais avec des solutions de risédronate couvrant la gamme de concentration de 0 à 12 mM. Les solutions d'adsorption, fraîchement préparées, ont été obtenues en dissolvant la quantité appropriée de BP dans une solution de KCl (1 mM). Toutes les expériences ont été réalisées à pH ~ 7,4 et T ~ 37°C.

II-1-2- Réversibilité

L'étude de la réversibilité du processus d'adsorption a été réalisée selon un protocole expérimental similaire à celui décrit dans la littérature (Barroug et al., 1998; Shimabayashi et al., 1991; Misra, 1997).

Les tests d'adsorption (50 mg dans 5 ml) ont été menés sur une apatite maturée 30 jours (ANC-30j) avec des concentrations en risédronate de 0,12 à 4,24 mM. Ces concentrations se situent respectivement avant et sur le palier de saturation. Après centrifugation des suspensions obtenues à l'équilibre, les surnageants ont été retirés et les poudres, non séchés, ont été remises en suspension pendant 20 minutes dans le même volume d'une solution de KCl (1mM, pH ~ 7,4). Ensuite les nouvelles suspensions obtenues ont été centrifugées et les surnageants ont été retirés puis analysés. Cette opération a été répétée trois fois sur le même culot.

II-1-3- Analyses chimiques

La caractérisation des solutions d'adsorbats avant et après interaction a été réalisée conformément au protocole expérimental adopté dans le chapitre II de ce manuscrit. Les teneurs en ions phosphate, calcium et risédronate ont été déterminées respectivement par colorimétrie utilisant le complexe phospho-vanado-molybdique, par spectroscopie d'émission optique sur plasma inductif (ICP/OES), et par spectrophotométrie UV à 262 nm.

II-1-4- Caractérisation du support après adsorption

Le protocole expérimental adopté pour la préparation des échantillons examinés dans cette partie est identique à celui utilisé est décrit dans le paragraphe I-2 du troisième chapitre. Après mise en contact (1 heure à pH ~ 7,4 et à 37°C) des apatites étudiées en présence d'une solution de risédronate de concentration désirée, les poudres récupérées après centrifugation et filtration (0,4 mm) ont été lavées avec environ 250 ml de solutions de KCl (1 mM, pH_{initial} ~ 7,4) puis lyophilisées pendant une nuit. Les échantillons témoins ont été traités dans des conditions semblables à celles des tests d'adsorption mais sans adsorbat.

II-1-5- Evolution des supports ANC en présence de risédronate

Les échantillons d'apatites (100 mg) ont été mis en suspension dans des tubes en polyéthylène (contenance 15 ml) avec 10 ml de solution désirée. Ces solutions sont constituées de chlorure de potassium 1mM (KCl) qui servira de témoin ou du même milieu contenant le risédronate de concentration 11,42 mM (BP); cette concentration correspond à la fin du palier d'adsorption. Le pH initial de ces solutions a été ajusté à une valeur de 7,4. Après incubation à 37°C durant des périodes variables (1 heure à 20 jours), les suspensions obtenues ont été centrifugées et filtrées. Les poudres récupérées après traitement sont lavées sur millipore (0,4 mm) par des solutions de KCl (1 mM, pH_{initial} 7,4) puis mises au lyophilisateur pendant une nuit.

II-2- Résultats

II-2-1- Cinétique d'adsorption

Les cinétiques de rétention du risédronate par les apatites examinées (ANC) ont été réalisées avec des solutions d'adsorbat de concentration 1,43 mM. L'évolution de la quantité de BP retenue par ces matériaux en fonction de la durée d'incubation est représentée sur la figure IV-1.

L'examen des courbes obtenues montre l'apparition d'un plateau de saturation après environ 10 min de mise en contact des supports ANC avec la solution de risédronate; ceci atteste de la grande réactivité de la surface des apatites examinées vis-à-vis des molécules du risédronate. Afin de limiter le phénomène d'évolution de ces solides lors du processus d'adsorption, nous avons fixé la durée de contact adsorbant-adsorbat à 1 heure pour le reste de notre étude. Cette durée reste inférieure à celle adoptée dans le cas du support de référence, l'apatite bien cristallisée HA (2 heures).

II-2-2- Isotherme d'adsorption

Les données d'adsorption du risédronate par les supports ANC dans les conditions examinées ($\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$ et à $T \sim 37^\circ\text{C}$) sont regroupées dans le tableau IV-1. Dans la gamme de concentration examinée (0 à 12 mM), le taux de rétention varie de 46 à 100 %; pourcentage relativement supérieur à celui noté pour l'hydroxyapatite bien cristallisée (15 à 91 %).

L'évolution de la quantité de risédronate adsorbée par les apatites nanocristallines carbonatées examinées, en fonction de sa concentration à l'équilibre (Figure IV-2), montre des allures de type Langmuir. Les paramètres caractéristiques d'adsorption sont consignés dans le tableau IV-2. Comme on peut le voir, l'apatite maturée durant un jour (ANC-1j) fixe la plus grande quantité de molécules de risédronate, comparée aux apatites laissées dans leurs solutions mères pendant 6 et 30 jours. La surface occupée par molécule a été estimée à partir des quantités adsorbées par unité de surface des nanocritaux; elle est comprise entre 0,3 et 0,5 $\text{nm}^2/\text{molécule}$. Cette valeur reste légèrement inférieure à celle observée pour l'apatite de référence HA (0,7 $\text{nm}^2/\text{molécule}$).

II-2-3- Réversibilité

Nous avons suivi l'évolution des quantités de risédronate mises en solution au cours des lavages successifs des solides obtenus après centrifugation afin d'évaluer la réversibilité du processus d'adsorption. Les résultats obtenus (Tableau IV-3) indiquent que les quantités de risédronate désorbées lors du premier lavage sont très faibles et correspondent au plus à un taux de libération de 1,5 % pour les faibles concentrations et 5 % pour les concentrations se situant dans le domaine de saturation. Les taux cumulés libérés après les 3 lavages ne dépassent guère la fourchette 1,7 % - 6,3 % dans les conditions examinées. Ces observations laissent penser que la fixation de risédronate par l'apatite de basse cristallinité se fait de manière non réversible ou que le processus de désorption est extrêmement lent. Il est à noter par ailleurs que le faible taux de désorption obtenu pourrait être dû pour une bonne part à la dilution de la quantité interstitielle de solution retenue dans les premiers culots.

Tableau IV-1: Données d'adsorption de BP par ANC à $T \sim 37^{\circ}\text{C}$ et $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$:
Concentration initiale (C_0), concentration à l'équilibre (C_e), quantité fixée (Q) et pourcentage d'adsorption.

ANC-1j

C_0 (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Q (mmol/g)	Ads (%)
0	0	0	0	0
0,91	0,00	0,94	0,09	100,00
1,81	0,09	1,79	0,17	94,80
4,41	0,87	3,70	0,35	80,31
5,57	1,58	4,15	0,40	71,54
8,41	3,64	4,98	0,48	56,73
11,81	5,96	6,10	0,58	49,54

ANC-6j

C_0 (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Q (mmol/g)	Ads (%)
0	0	0	0	0
0,91	0,02	0,44	0,09	98,19
1,81	0,12	0,84	0,17	93,29
4,41	0,83	1,78	0,36	81,17
5,57	1,47	2,03	0,41	73,53
8,41	3,22	2,58	0,52	61,75
11,81	5,70	3,04	0,61	51,73

ANC-30j

C_0 (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Q (mmol/g)	Ads (%)
0	0	0	0	0
0,91	0,00	0,51	0,09	99,64
1,81	0,12	0,96	0,17	93,53
4,41	0,97	1,95	0,34	77,96
5,57	1,81	2,13	0,38	67,42
8,41	3,91	2,55	0,45	53,48
11,81	6,43	3,05	0,54	45,50

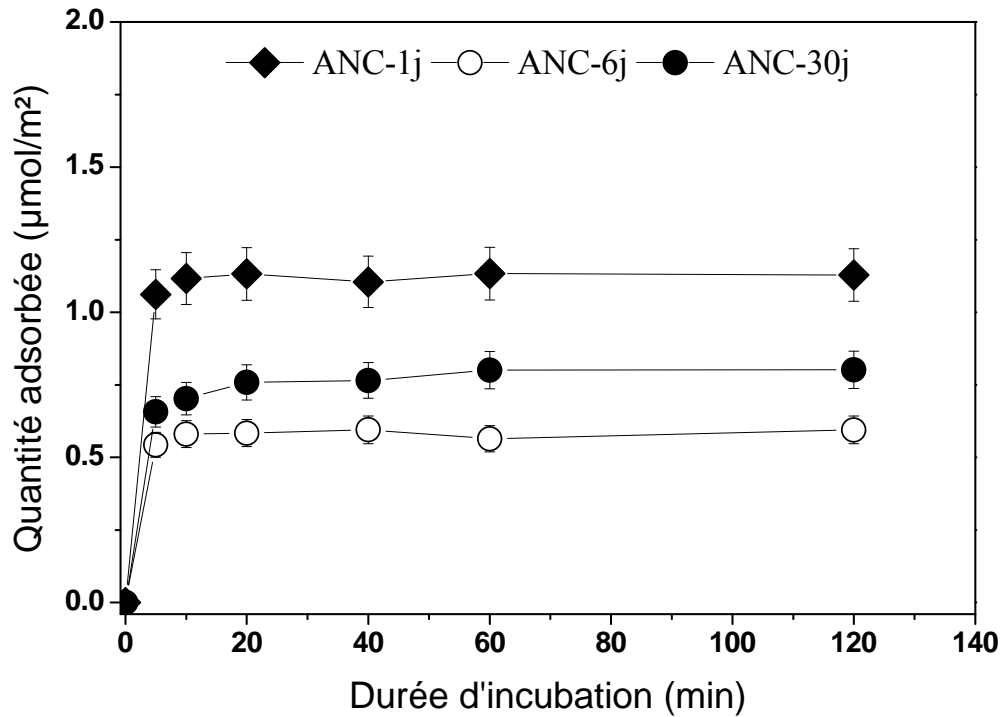


Figure IV-1: Cinétique d'adsorption du risédronate par les supports ANC à $T \sim 37^\circ\text{C}$ en milieu KCl (1 mM) de $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$.

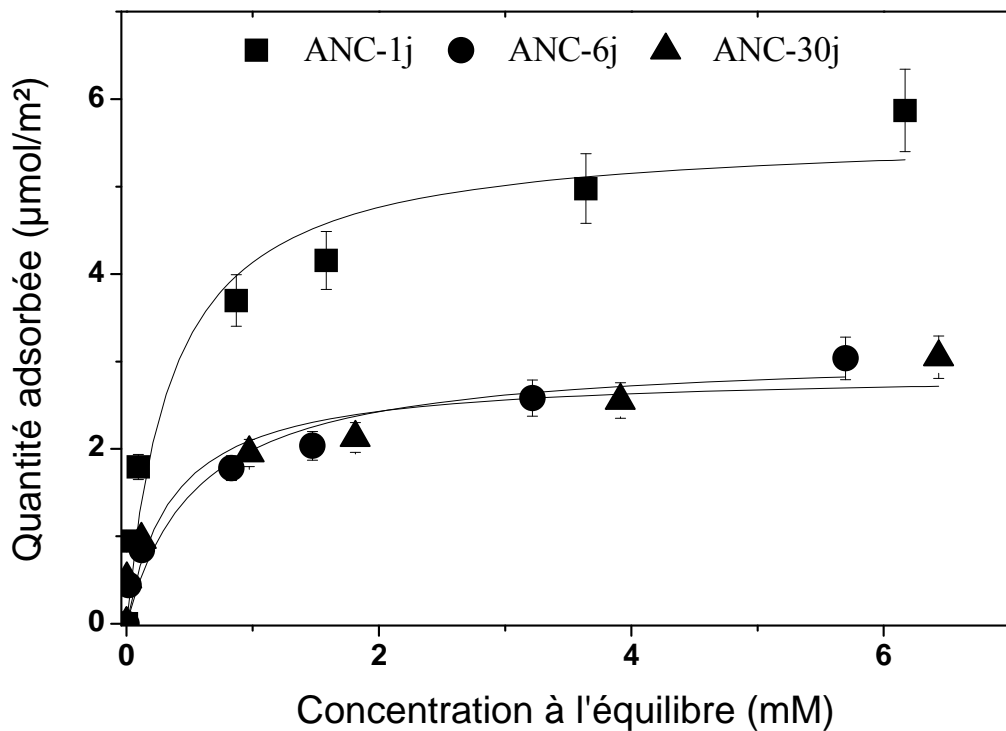


Figure IV-2: Isothermes d'adsorption à $T \sim 37^\circ\text{C}$ du risédronate par les apatites obtenues à différents temps de maturation : milieu KCl (1mM) de $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$.

Tableau IV-2: Paramètres d'adsorption à T ~37°C du risédronate par ANC en milieu KCl (1 mM) de pH_{initial} ~ 7, 4.

Adsorbant	$N \pm \Delta N$ ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	$N \pm \Delta N$ (mmol/g)	$K \pm \Delta K$ (L/mmol)	δ (nm^2)
ANC-1j	$5,9 \pm 1,2$	$0,6 \pm 0,1$	$2,7 \pm 1,0$	0,30
ANC-6j	$3,2 \pm 0,6$	$0,6 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,7$	0,50
ANC-30j	$3,1 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,1$	$2,4 \pm 1,0$	0,50
HA*	$2,3 \pm 0,1$	$0,13 \pm 0,01$	$7,3 \pm 3,6$	0,70

* Apatite stoechiométrique: support considéré comme référence (chapitre III)

Tableau IV-3: Evolution de la quantité de risédronate désorbée après lavages successifs des culots obtenus après adsorption.

Equilibre d'adsorption		Désorption ($Q_{\text{désorbée}}$: $\mu\text{mol}/\text{m}^2$)			$Q_{\text{désorbée}}$ totale (%)
C_e (mM)	Q_{ads} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	1 ^{er} lavage	2 ^{ème} lavage	3 ^{ème} lavage	
0,12	0,96	0,014	< 0,001	< 0,001	1,7
1,95	2,14	0,024	0,009	0,006	1,8
4,24	2,61	0,134	0,019	0,0113	6,3

II-2-4- Influence de l'adsorption sur la composition du milieu

Les résultats d'analyses chimiques des surnageants obtenus après adsorption par les supports étudiés sont reportés dans le tableau IV-4. La fixation des molécules de risédronate à la surface des apatites ne semble pas induire une modification du pH du milieu dans les conditions examinées. Cependant, la comparaison de composition des filtrats des suspensions avec et sans adsorbat met en évidence une augmentation assez importante des teneurs en ions phosphate en solution lors de l'adsorption par rapport aux ions calcium.

L'évolution des teneurs en ions minéraux en fonction des quantités adsorbées dans la gamme de concentration examinée (0 – 12 mM) indique une mise en solution progressive des ions phosphate (Figure IV-3); cependant la libération des ions calcium est non monotone et varie légèrement au cours de l'adsorption. Les pentes des droites obtenues ainsi que les coefficients correspondants sont consignés dans le tableau IV-5.

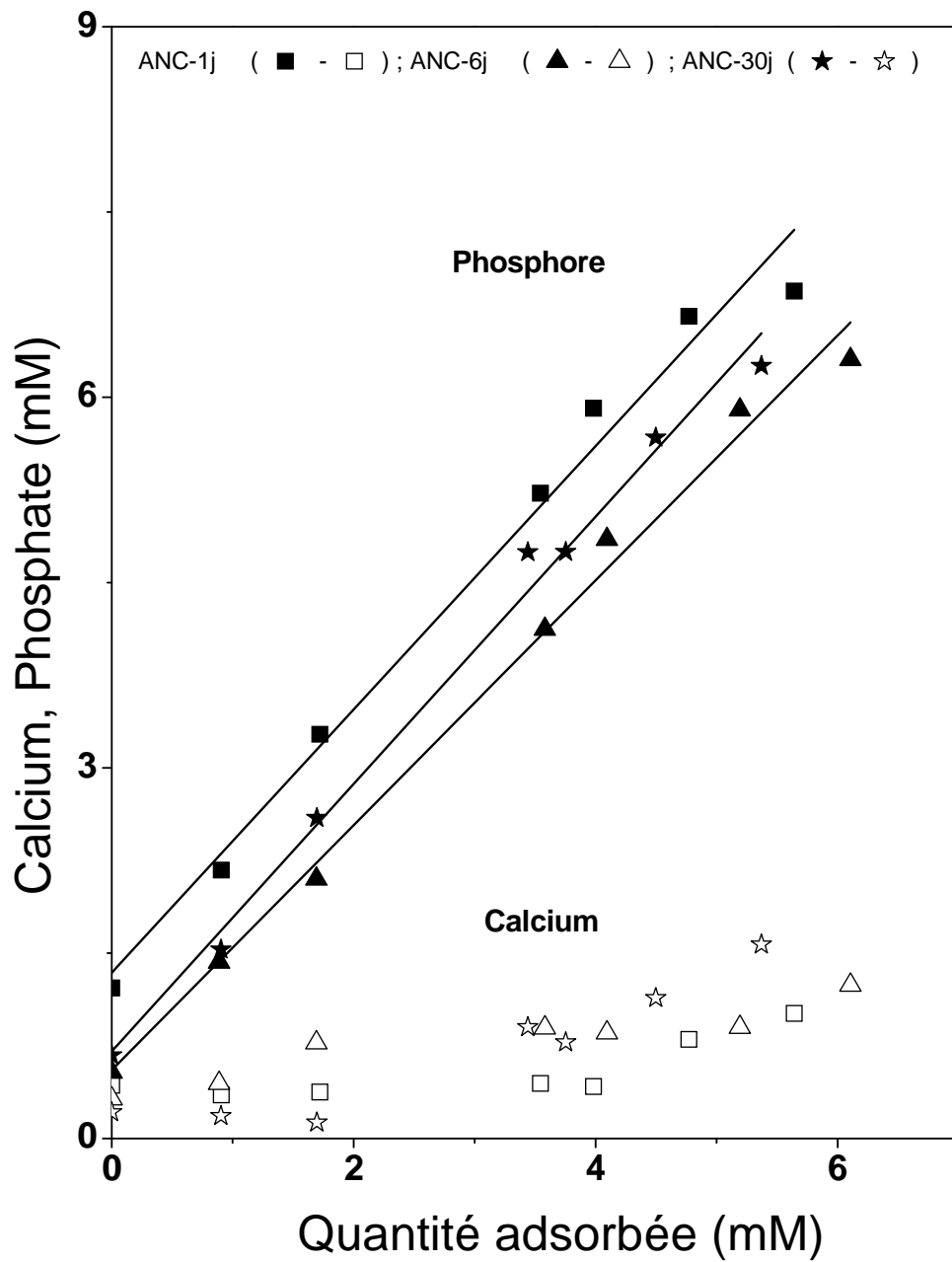


Figure IV-3: Evolution des teneurs en ions phosphate (symboles fermés) et calcium (symboles ouverts) libérés en fonction des quantités de risédronate adsorbées par les supports ANC à différents temps de maturation.

Tableau IV-4: Composition des solutions après adsorption du risédronate (BP) par ANC dans un milieu KCl à $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$ et 37°C .

ANC- 1j

Q (mM)	P (mM)	Ca (mM)	$\text{pH}_{\text{Initial}} - \text{pH}_{\text{final}}$
0,00	1,22	0,43	7,4 – 6,9
0,91	2,17	0,35	7,4 – 7,4
1,72	3,27	0,38	7,5 – 7,4
3,54	5,22	0,45	7,3 – 7,4
3,98	5,91	0,42	7,4 – 7,4
4,77	6,66	0,80	7,4 – 7,4
5,64	6,86	1,01	7,4 – 7,4

ANC- 6j

Q (mM)	P (mM)	Ca (mM)	$\text{pH}_{\text{Initial}} - \text{pH}_{\text{final}}$
0,00	0,54	0,32	7,5 – 7,2
0,89	1,43	0,45	7,4 – 7,4
1,69	2,10	0,77	7,5 – 7,5
3,58	4,12	0,90	7,3 – 7,4
4,09	4,85	0,86	7,4 – 7,5
5,19	5,90	0,90	7,4 – 7,6
6,11	6,31	1,24	7,4 – 7,5

ANC- 30j

Q (mM)	P (mM)	Ca (mM)	$\text{pH}_{\text{Initial}} - \text{pH}_{\text{final}}$
0,00	0,67	0,21	7,4 – 7,1
0,90	1,53	0,18	7,4 – 7,4
1,70	2,59	0,13	7,5 – 7,5
3,44	4,75	0,90	7,3 – 7,4
3,75	4,75	0,78	7,4 – 7,5
4,50	5,67	1,14	7,4 – 7,5
5,37	6,25	1,57	7,4 – 7,5

Tableau IV-5: Coefficients de proportionnalité entre phosphates libérés et risédronates adsorbés.

	Pente (± erreur absolue)	Ordonnée à l'origine (± erreur absolue)	Coefficient de corrélation (r ²)
ANC-1j	1,07 ± 0,21	1,34 ± 0,21	0,98
ANC-6j	0,99 ± 0,03	0,55 ± 0,14	0,99
ANC-30j	1,08 ± 0,04	0,71 ± 0,14	0,99

II-3- Caractérisation du support après adsorption

II-3-1- Diffraction des rayons X

Les diagrammes de diffraction des rayons X obtenus après adsorption présentent tous des raies larges et mal résolues caractéristiques d'apatites de basse cristallinité et ne montrent aucune phase étrangère. L'évolution de la taille des cristallites a été estimée, en utilisant la formule de Scherrer, sur les échantillons mis en contact avec différentes concentrations de risédronate correspondant à la partie ascendante de l'isotherme d'adsorption (1,81 mM), au début (5,57 mM) et à la fin du palier d'adsorption (11,81 mM). L'examen des résultats obtenus (Tableau IV-6) ne montre aucune variation significative de la taille des cristallites suite à l'interaction avec les molécules de risédronate. Il s'agit toujours de cristallites de forme allongée et de taille comparable à l'apatite de référence.

II-3-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF)

Les spectres infrarouges des apatites examinées avant et après adsorption des molécules de risédronate sont présentés sur la figure IV-4. Les spectres des sels de calcium du risédronate préparés sont également reproduits pour comparaison.

Les bandes de vibration caractéristiques des échantillons de départ restent inchangées après adsorption. Cependant des bandes supplémentaires se manifestent dans la région 650-850 cm⁻¹ et ce pour les trois supports (ANC) étudiés. Un agrandissement de l'échelle dans cette zone montre clairement trois bandes de faible intensité situées à 676,7, 713,8 et 801,2 cm⁻¹; ces bandes sont similaires à celles notées sur les spectres des sels de calcium élaborés.

Tableau IV-6: Dimensions apparentes des cristallites d'apatites examinées avant et après adsorption de risédronate en fonction du temps de maturation.

	$L_{(002)} \pm 5 \text{ \AA}$	$L_{(310)} \pm 5 \text{ \AA}$	L (002)/L (310)
ANC-1j	242	86	2,8
ANC-1j/KCl	248	71	3,5
ANC-1j/BP 1,81 mM	256	78	3,3
ANC-1j/BP 5,57 mM	245	78	3,2
ANC-1j/BP 11,81 mM	257	77	3,3

ANC-6j	295	90	3,3
ANC-6j/KCl	292	81	3,6
ANC-6j/BP 1,81mM	313	95	3,3
ANC-6j/BP 5,57 mM	298	90	3,3
ANC-6j/BP 11,81 mM	291	78	3,8

ANC-30j	349	98	3,6
ANC-30j/KCl	347	97	3,6
ANC-30j/BP 1,81mM	347	104	3,3
ANC-30j/BP 5,57 mM	350	94	3,7
ANC-30j/BP 11,81 mM	351	93	3,8

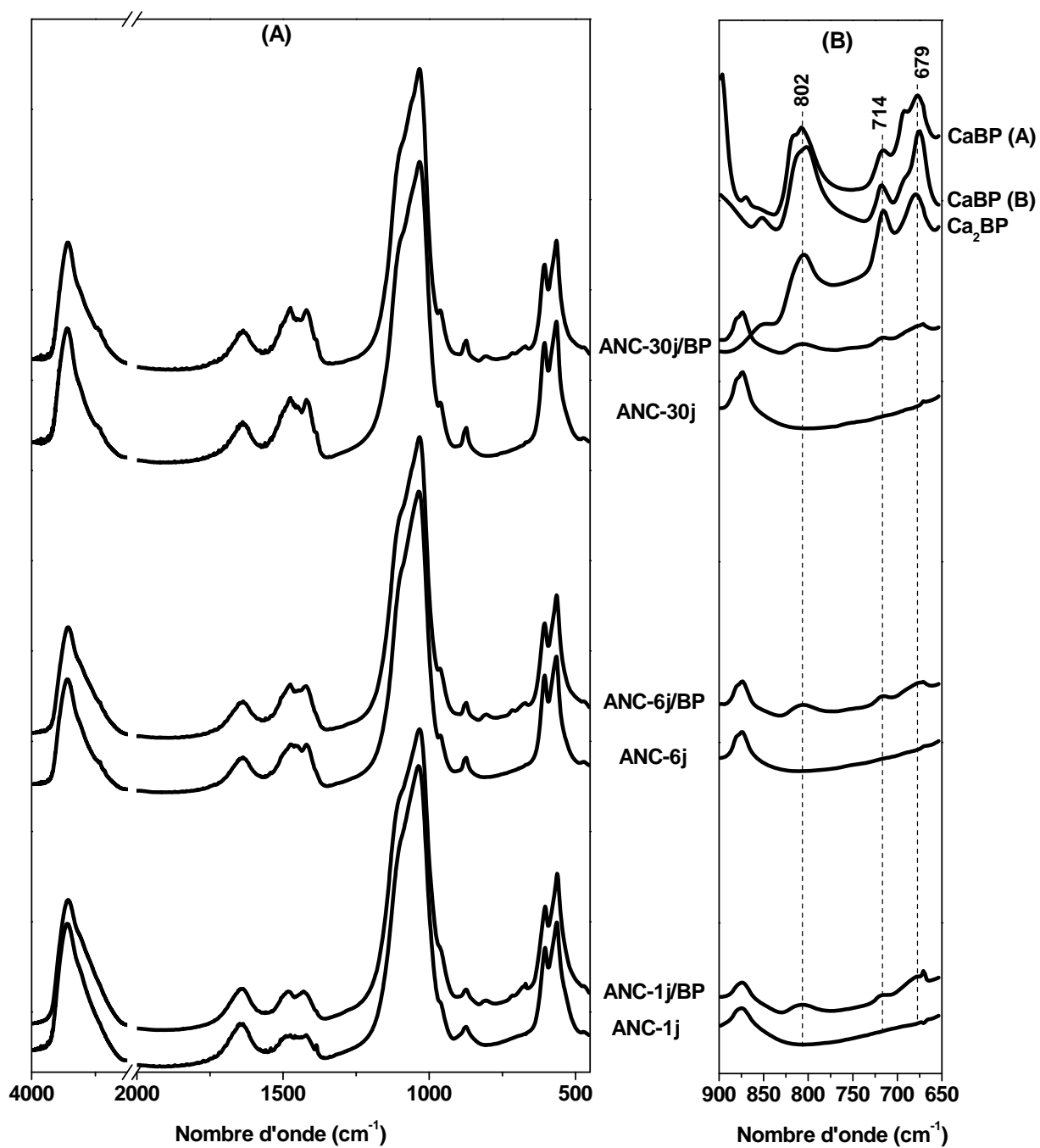


Figure IV-4: Spectres d'absorption infrarouge des apatites nanocristallines carbonatés obtenues avant et après interaction avec les molécules de risédronate: milieu KCl , $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$ et $T \sim 37^\circ\text{C}$: comparaison avec les spectres des sels de calcium.

II-3-4- Spectrométrie par diffusion Raman

Les analyses par diffusion Raman réalisées sur les poudres obtenues après interaction avec les molécules de BP (Figure IV-5) révèlent plusieurs différences par rapport aux spectres des échantillons de référence. Il est à noter que seul le spectre de l'apatite ANC-1j avant adsorption a été reporté sur la figure. Dans tous les cas on assiste à l'apparition de plusieurs bandes supplémentaires relatives aux modes de vibration des molécules de risédronate: la région spectrale située entre 1000 et 1700 cm^{-1} met en évidence la présence de bandes de vibrations caractéristiques de la pyridine alors que les bandes de vibration associées aux liaisons C – P de la molécule de risédronate se manifestent vers 646 et 677 cm^{-1} . Les bandes de vibrations supplémentaires ainsi notées sur les apatites après adsorption présentent une grande similitude avec celles notées sur les spectres des sels de calcium, en particulier le précipité Ca_2BP .

II-3-5- Spectroscopie RMN de l'état solide

Les spectres RMN ^1H SPE-MAS des poudres d'apatites examinées après adsorption (Figure IV-6) montrent une augmentation des largeurs à mi-hauteur des pics attribués aux molécules d'eau (5,6 ppm), également visible sur les spectres des apatites de départ. On assiste en outre à l'apparition de deux pics de faible intensité vers 3,8 et 8,25 ppm. Le signal positionné vers 8,25 ppm paraît mieux résolu lorsque le temps de maturation augmente; par ailleurs, ce pic additionnel se superpose avec l'épaulement noté entre 8,1 et 9,4 ppm dans le spectre du précipité Ca_2BP .

Les spectres RMN ^{31}P SPE-MAS et $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP MAS (temps de contact = 5ms) des trois supports étudiés après adsorption, du risédronate seul et de son sel de calcium (Ca_2BP) sont reportés sur la figure IV-7. L'usage de ces deux techniques permet de déceler la présence des molécules de risédronate à la surface des apatites examinées. En effet, on remarque en plus du pic dissymétrique entre 3,3 et 3,4 ppm attribué aux groupements phosphate apatitique des solides avant adsorption, l'apparition d'un pic large supplémentaire centré à environ 18 ppm similaire à celui qu'on trouve dans le sel de calcium de risédronate noté Ca_2BP . L'intensité de ce pic additionnel est plus grande dans le cas des spectres obtenus par $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP MAS que par RMN ^{31}P MAS; ceci peut être attribué à la contribution des protons présents dans l'environnement des groupements phosphonate de la molécule étudiée. Notons par ailleurs que les spectres RMN des autres sels de risédronate de calcium élaborés (CaBP(A) et CaBP(B)), présentent différents pics plus au moins fins avec des positions variables (Chapitre II, partie B); ceci laisse penser que les molécules de risédronate adsorbées à la surface des apatites possèdent le même environnement chimique que celui du sel de calcium Ca_2BP .

II-3-6- Analyse thermogravimétrique et différentielle

Les courbes obtenues par analyse thermogravimétrique et différentielle effectuées à l'air et température variable entre 25°C et 900°C sur les apatites (ANC) avant et après adsorption sont présentées sur la figure IV-8. Les thermogrammes des supports avant adsorption donnent dans l'intervalle de température explorée une perte massique totale qui varie entre 13 à 16 %; celle-ci peut être subdivisée en trois étapes. On assiste d'abord à une perte de poids du produit initial d'environ 13 % entre la température ambiante et 250°C, qui correspond à l'eau adsorbée sur les nanocristaux et à l'eau associée aux environnements labiles. Le palier de la deuxième perte de masse (0,5 %) qui est très faible et mal défini (en particulier sur les spectres réduits), se manifeste entre 250°C et 550°C; cette perte peut être attribuée à de l'eau fortement liée ou intracristalline (Heughebaert, 1977) et/ou à la condensation des ions hydrogénophosphate (HPO_4^{2-}) en ions pyrophosphate ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$). La troisième perte de masse estimée à environ 1,5 % se produit entre 650°C et 800°C; elle correspond à la réaction d'une partie des ions $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ avec les ions OH^- de la structure apatitique (Mihai, 2005) et/ou à la décomposition partielle des ions carbonate (Tadic et al., 2002).

L'examen des courbes thermogravimétriques des supports après adsorption du risédronate révèle trois pertes bien distinctes. Par comparaison avec les thermogrammes enregistrés avant adsorption, on note une similarité entre la première et la troisième perte. Tandis que la deuxième perte, enregistrée entre 250 et 550°C, apparaît plus importante : une perte très nette de 6 % est clairement visible sur les thermogrammes. Cette perte correspond sensiblement à la partie décomposable volatile des molécules de biphosphonate. En effet si on considère que la décomposition thermique des ions bisphosphonate dans cette gamme de température donne lieu à des ions pyrophosphate, on peut évaluer la masse de la partie susceptible d'être volatile:

$$\begin{aligned} M_{\text{volatile}} &\approx M_{\text{risédronate monosodique}} - 2,5M_{\text{H}_2\text{O}} - M_{\text{Na}} - M_{\text{P}_2\text{O}_7} \\ &\approx 350,14 - 2,5 \cdot (18) - 23 - 174 \approx 108 \text{ g.mol}^{-1}. \end{aligned}$$

Connaissant la quantité de risédronate adsorbée à la saturation qui est de 0,6 mmol/g d'apatite, on peut déduire le pourcentage en masse correspondant à la masse évaluée précédemment:

$$\% \text{ massique correspondant à la masse volatile} = 0,6 \cdot 10^{-3} \times 108 \times 100 = 6,48$$

Soit environ 6,5 % ce qui correspond bien à la perte de masse notée sur les thermogrammes obtenus.

La courbe ATD correspondant à la seconde perte de poids donne lieu à deux maxima sur la courbe thermique dérivée; l'un important apparaît à 330°C et le second plus faible se manifeste vers 440°C. Ces événements exothermiques correspondent très probablement à deux étapes de décomposition distinctes de l'ion bisphosphate.

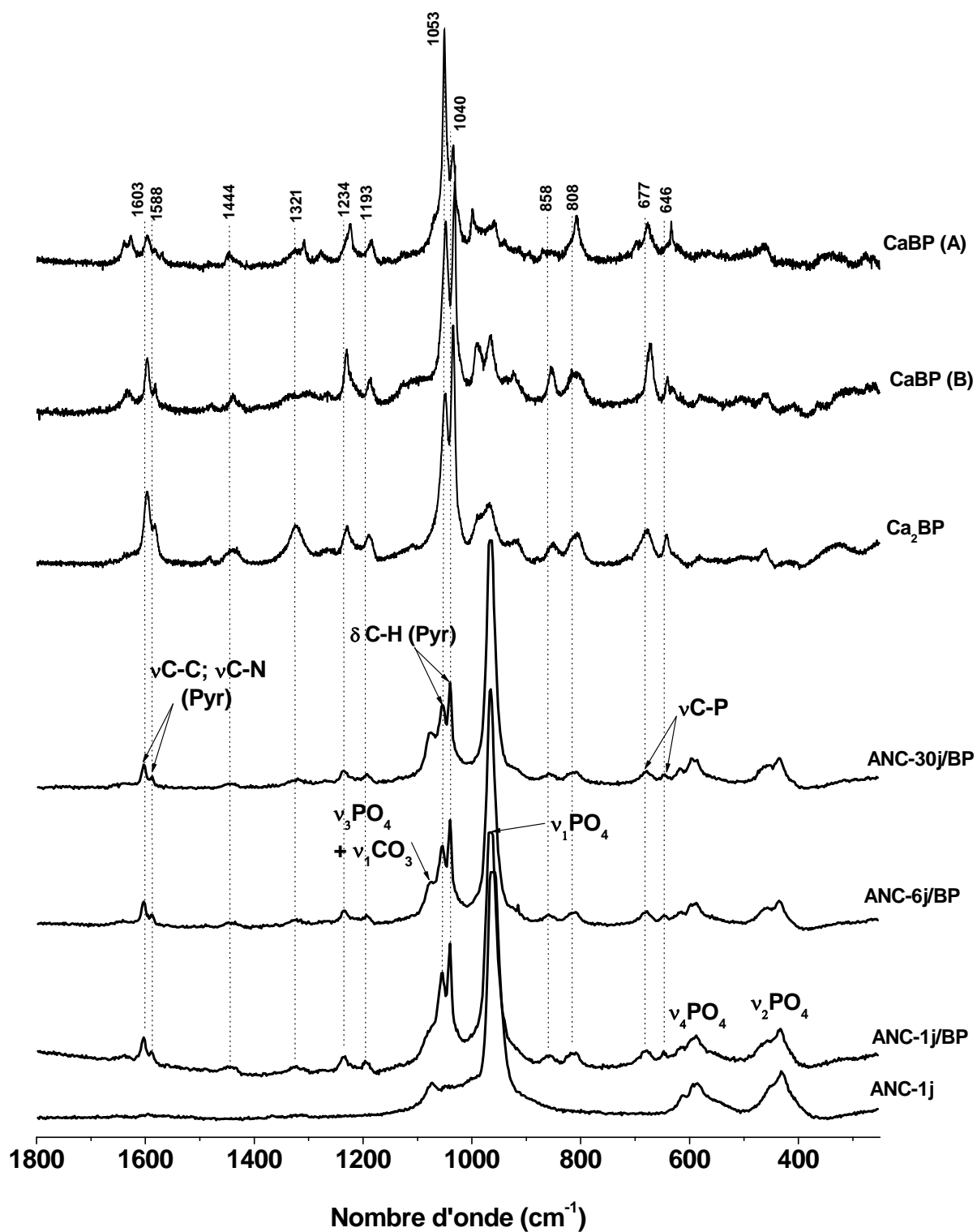


Figure IV-5: Spectres Raman obtenus après adsorption de BP à $T \sim 37^\circ\text{C}$ par les apatites examinées: milieu KCl (1 mM), $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$.

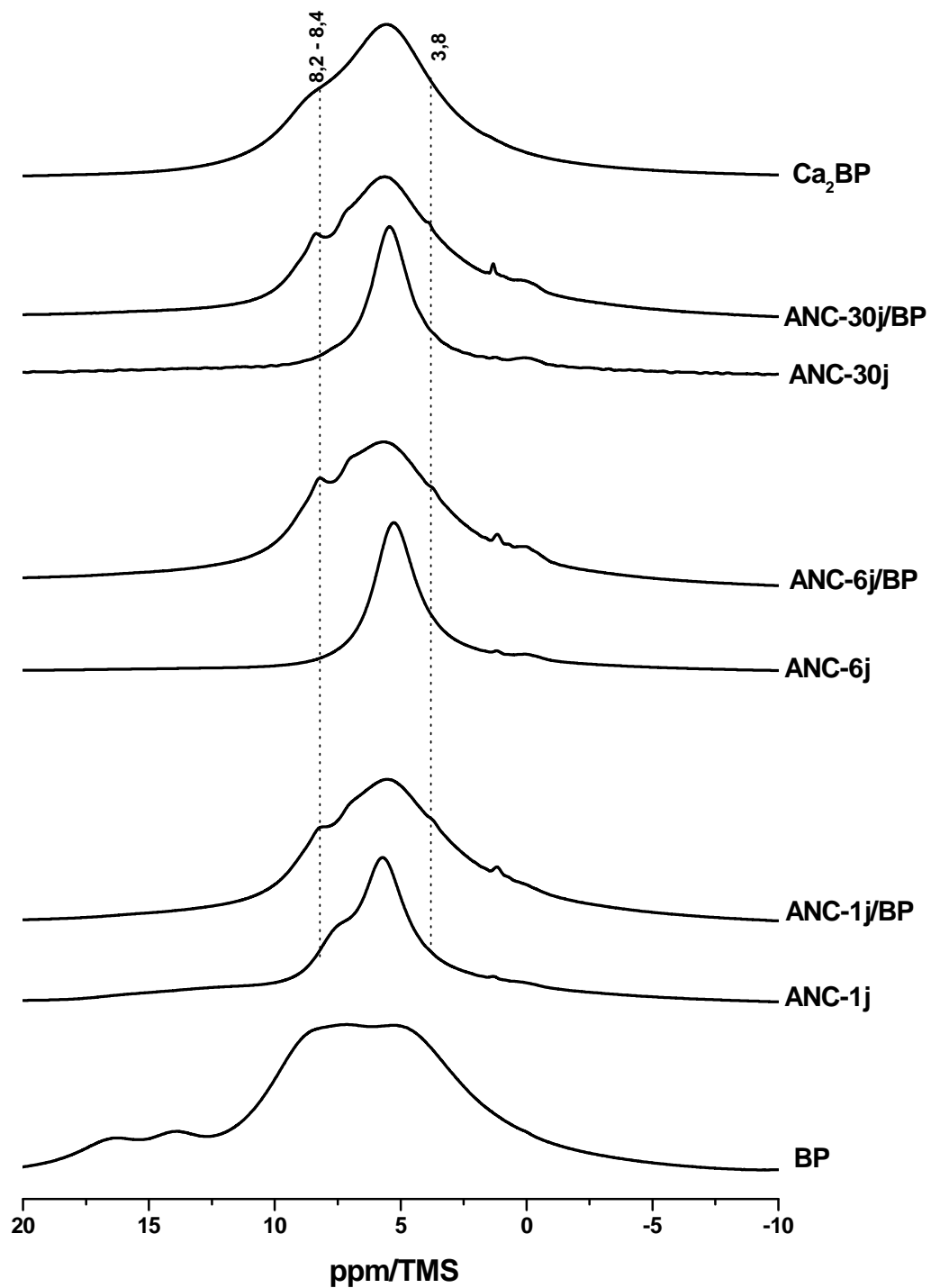


Figure IV-6: Spectres RMN ^1H SPE-MAS des apatites obtenues après adsorption à $T \sim 37^\circ\text{C}$ de BP: milieu KCl, $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$.

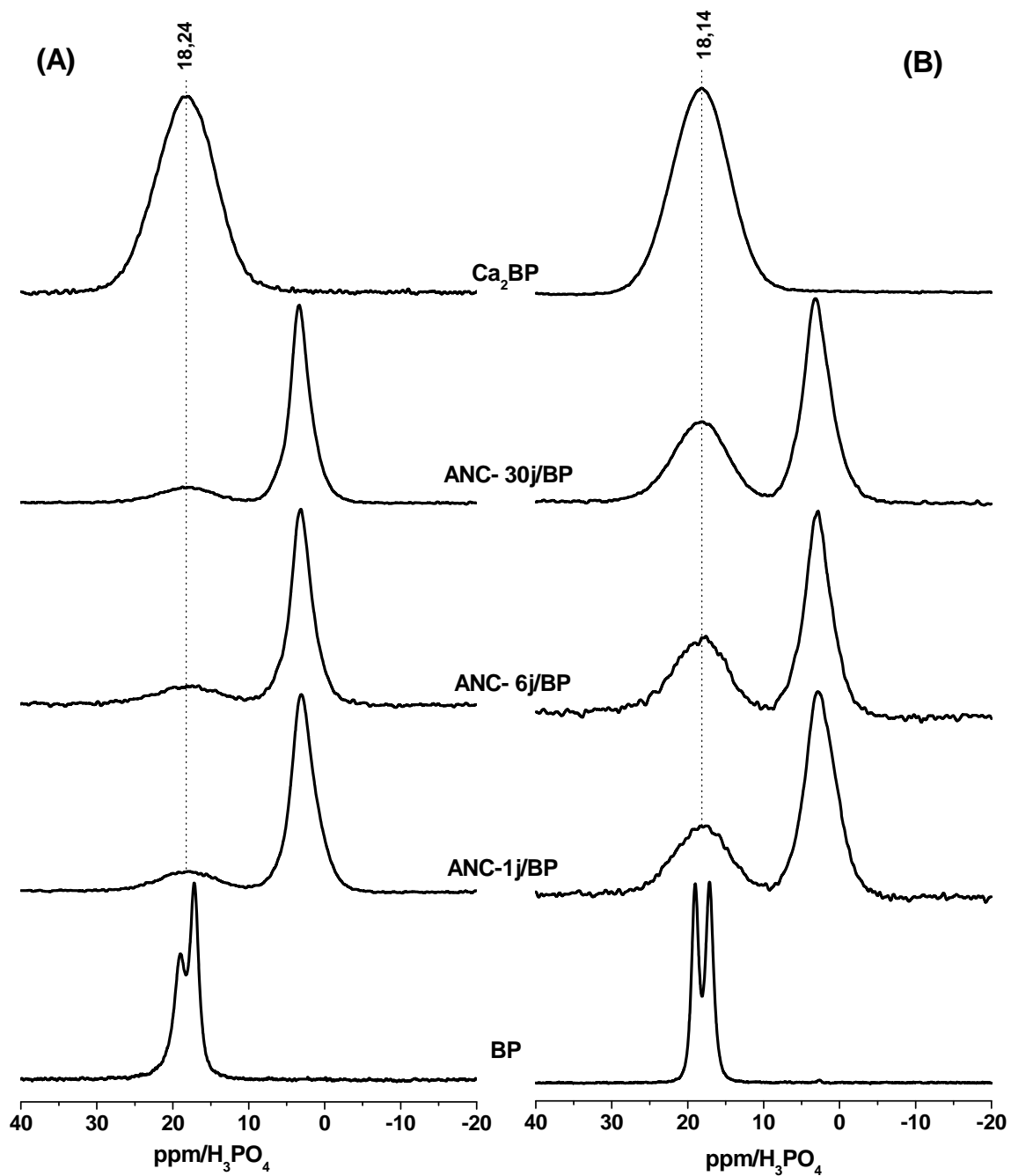


Figure IV-7: Spectres RMN de ^{31}P SPE-MAS (A) et $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP MAS (B) (temps de contact = 5ms) du risédronate seul, des supports après adsorption du risédronate, et du risédronate de calcium Ca_2BP .

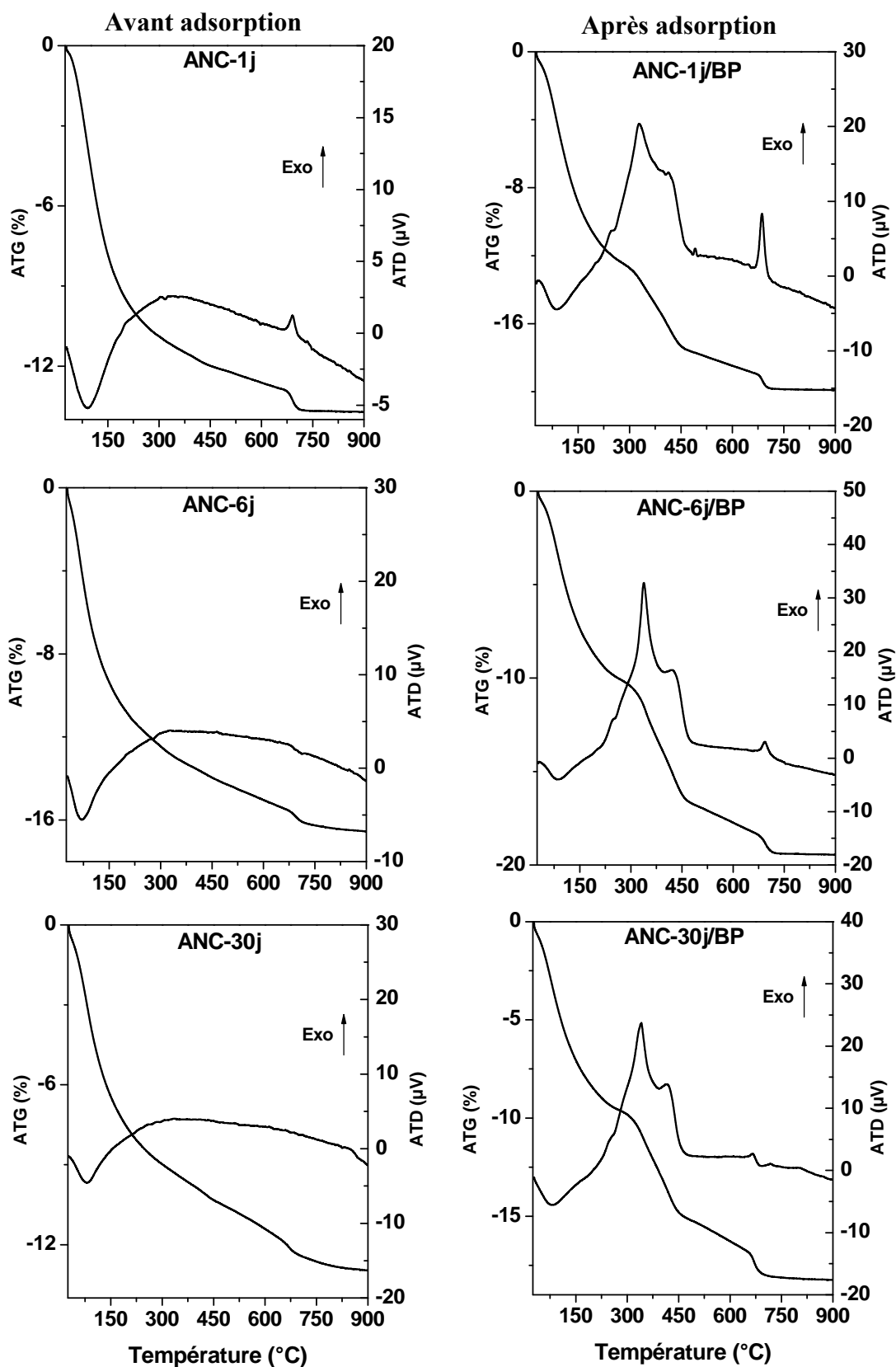


Figure IV-8: Thermogrammes (sous air et température de 25 à 900°C) des apatites nanocristallines carbonatées (ANC) avant et après adsorption du risédronate ($Q = 0,6 \text{ mmol/g}$).

II-3-7- Microscopie électronique à transmission (MET)

L'examen des clichés MET obtenus sur les apatites de références (avant adsorption) de maturation variable permet de constater que la morphologie des cristaux reste globalement la même au cours de la maturation avec toutefois une longueur qui a légèrement tendance à augmenter (Figure IV-9). De plus on observe des amas cristallins qui se présentent généralement sous forme de plaquettes de très faibles épaisseurs et ayant une forme allongée.

Les images prises sur les poudres ANC obtenues après adsorption des molécules de risédronate indiquent que les cristaux s'agrègent un peu moins par rapport aux clichés des poudres de référence et se dispersent mieux avec une sensible augmentation de la longueur des cristaux.

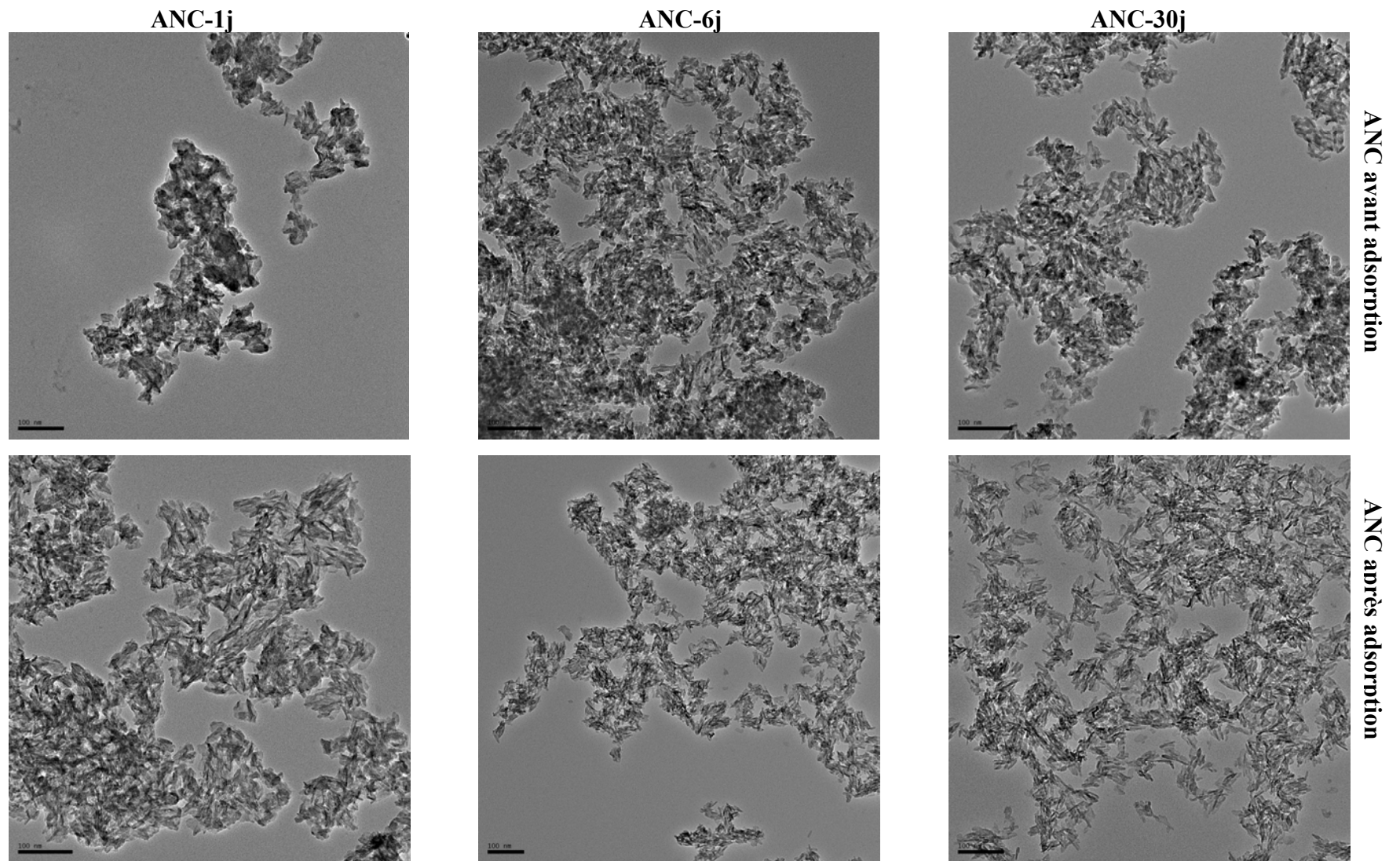


Figure IV-9 : Photos MET des apatites nanocristallines obtenues avant et après adsorption du risédronate.

II-4- Evolution des supports ANC en présence de risédronate

Comme il a été décrit précédemment, l'une des principales caractéristiques des apatites nanocristallines est leur capacité à évoluer en milieu aqueux. Cette maturation se traduit par des variations au cours du temps de la composition chimique, de l'état de cristallinité et de l'environnement des ions minéraux dans la phase solide. Ces modifications ont été clairement mises en évidence dans le cas de phosphates de calcium synthétiques (Hina, 1996; Cazalbou et al., 2004b). Cependant dans les milieux biologiques, d'autres facteurs interviennent et compliquent les processus de maturation : les phénomènes d'adsorption sont l'un des facteurs qui gouvernent la maturation de ces matériaux phosphocalciques.

Dans ce cadre, nous nous intéressons à évaluer l'influence de l'adsorption des molécules de risédronate sur l'évolution des apatites nanocristallines en solution. Pour cela, nous avons fait appel à deux techniques spectroscopiques complémentaires, FTIR et Raman, pour mettre en évidence toute éventuelle modification des caractéristiques physico-chimiques du précipité en présence des solutions de traitement. Le support utilisé dans cette étude est une apatite nanocristalline carbonatée maturée dans sa solution mère durant 1 jour. Pour une simplification d'écriture, le solide traité dans un milieu donné sera désigné par: ANC/milieu de traitement.

II-4-1- Résultats

II-4-1-1- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier

Les spectres d'absorption infrarouge de l'échantillon ANC traité pour des durées variables dans les solutions étudiées (ANC/BP et ANC/KCl) sont caractéristiques d'apatites mal cristallisées (Figure IV-10). L'examen de ces spectres montre une évolution significative des principaux domaines d'absorption des ions phosphate entre 400 et 700 (ν_4 PO₄) et entre 800 et 1300 cm⁻¹ (ν_1 et ν_3 PO₄) ainsi que ceux des ions carbonate entre 1360 et 1560 cm⁻¹ (ν_3 CO₃). Les spectres des supports traités en présence d'adsorbat (ANC/BP) indiquent, en plus des bandes notées dans les témoins, la présence de bandes supplémentaires entre 650 et 850 cm⁻¹ caractéristiques des molécules de bisphosphonate; celles-ci sont similaires à celles observées dans les sels de risédronate de calcium synthétisés.

L'agrandissement dans les régions spectrales spécifiques aux modes de vibrations des ions phosphate, carbonate et hydroxyle a été effectué afin de visualiser au mieux l'évolution du support ANC dans les milieux étudiés (Figure IV-11).

L'examen des spectres obtenus dans la région spectrale située entre 800 et 1300 cm⁻¹ indique (Figure IV-11) que le traitement de l'apatite en présence du chlorure de potassium (ANC/KCl) se traduit par une meilleure résolution avec le temps des bandes

d'absorption infrarouge spécifiques aux modes de vibration ν_1 et ν_3 des groupements PO_4 . Par ailleurs, ces bandes restent larges et mal résolues lorsque l'apatite est incubée en présence de bisphosphonate (ANC/BP).

Le domaine de vibration spécifique au mode de vibration ν_3 des carbonates (1300 et 1600 cm^{-1}) de l'apatite traitée en présence de l'électrolyte KCl révèle la présence de bandes de vibrations relatives aux ions carbonate de type A vers 1550 cm^{-1} et de type B vers 1419 et 1460 cm^{-1} . Ces bandes apparaissent dès le premier jour de traitement et deviennent de plus en plus définies au cours du temps d'incubation. Ces observations suggèrent une évolution sensible de l'apatite vers des composés de mieux en mieux cristallisés. Cependant, l'incubation de l'apatite en présence de bisphosphonates montre une tendance différente. Les spectres montrent deux bandes de même intensité situées vers 1433 et 1480 cm^{-1} ; celles-ci peuvent éventuellement être associées à des groupements carbonate non-apatitiques (Heughebaert, 1977). En outre, on note après 7 jours d'incubation l'apparition de deux bandes de faible intensité vers 1545 et 1566 cm^{-1} caractéristiques respectivement d'ions carbonate de type A et du risédronate.

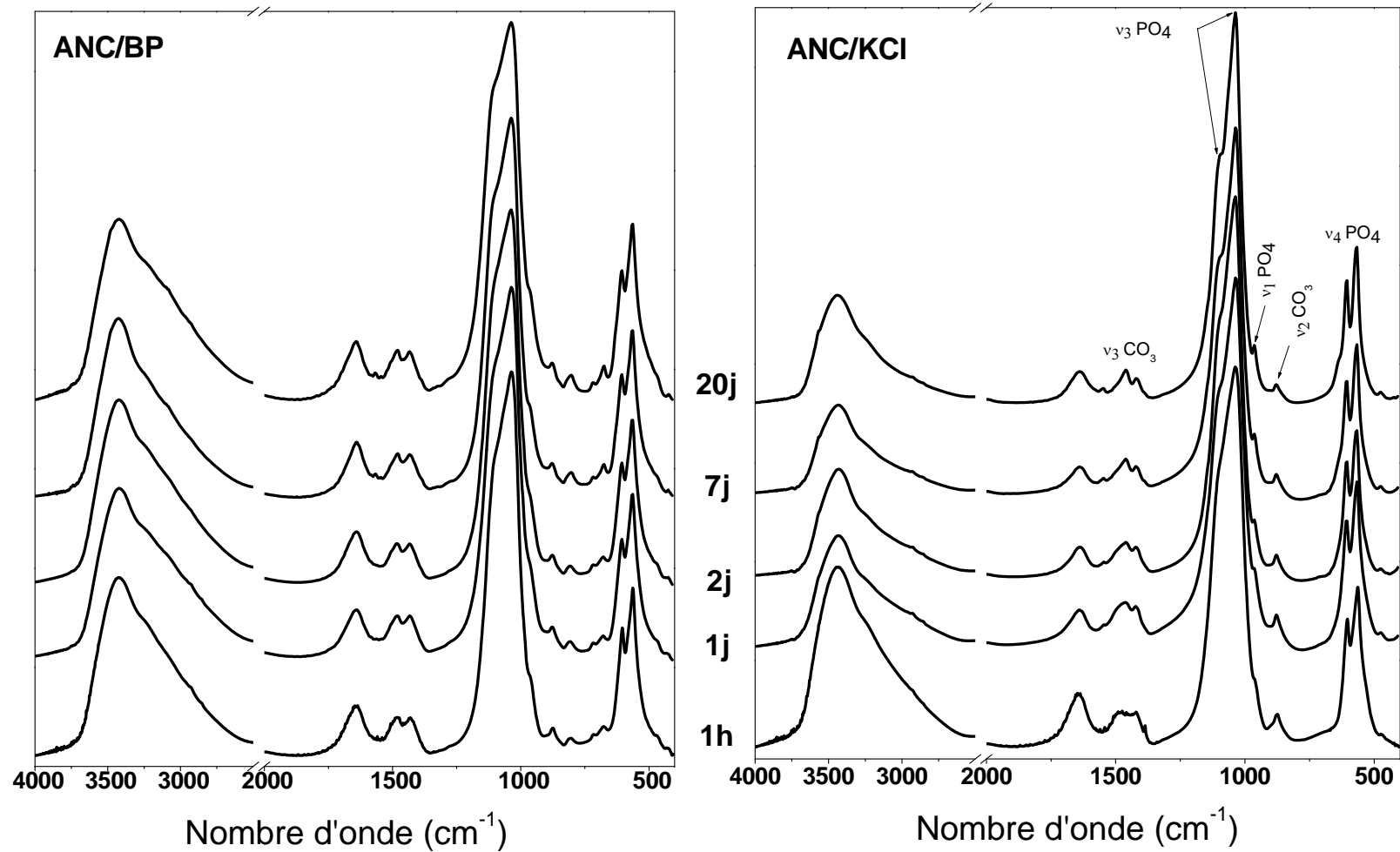
Les spectres enregistrés dans la région spectrale entre 3200 et 3700 cm^{-1} indiquent pour l'apatite évoluant dans un milieu KCl l'apparition d'un épaulement vers 3570 cm^{-1} caractéristique du mode de vibration ν_s des groupements OH dans le réseau apatitique. Cette observation traduit l'amélioration de la cristallinité de l'apatite maturée comparée à l'apatite de référence. Par contre, cette évolution ne se manifeste pas dans le cas de l'apatite en présence des molécules de risédronate. Cela laisse penser que l'adsorption des groupements bisphosphonate à la surface des cristaux apatitiques inhibe l'évolution des apatites vers un meilleur état de cristallinité.

Afin de mieux mettre en évidence l'évolution de l'apatite maturée en présence et en l'absence des molécules de risédronate, nous avons procédé à la décomposition de la bande d'absorption d'ions phosphate entre 480 et 660 cm^{-1} ($\nu_4 \text{ PO}_4$). Ce traitement mathématique de décomposition a été réalisé, comme nous l'avons décrit antérieurement (Chap II, paragraphe III-2-2), en utilisant le logiciel GRAMS/AI version 8.0. Les attributions des bandes correspondant au domaine $\nu_4 \text{ PO}_4$ sont illustrées sur la figure IV-12. Dans le cas des spectres relatifs aux échantillons traités en présence de risédronate (ANC/BP) une soustraction des bandes dues aux bisphosphonates doit être réalisée afin de tenir en compte d'éventuelles perturbations des bandes phosphates apatitiques par celle de bisphosphonates. Vu les faibles quantités adsorbées par unité de masse, la soustraction n'a pu être réalisée avec précision sans déformation de la bande $\nu_4 \text{ PO}_4$ de l'apatite. Cependant, nous avons

ajoutés dans notre modèle de décomposition d'autres bandes relatives à celle du risédronate.

Le rapport des aires des bandes des espèces phosphate (PO_4 non-apatitique, HPO_4 apatitique et HPO_4 non-apatitique) par rapport à l'aire de l'ensemble de la bande phosphate a été calculé. L'évolution de l'environnement des ions phosphate au cours du traitement de ANC dans les deux milieux étudiés (ANC/BP, ANC/KCl) est reportée sur la figure IV-13. Dans le cas de l'apatite traitée dans un milieu KCl on assiste d'une manière générale à une diminution des proportions de groupements HPO_4 et PO_4 non-apatitiques, tandis que la quantité relative aux ions HPO_4^{2-} apatitiques reste relativement stable au cours du temps de traitement.. Cependant on assiste à l'apparition des groupements hydroxyle apatitiques après un jour et leur intensité augmente sensiblement avec la durée de traitement.

Dans le cas de l'apatite évoluée en présence du risédronate, on remarque que la proportion des groupements phosphate labiles évolue faiblement et reste stable au cours du temps. Néanmoins, une légère diminution de ceux-ci est observée à partir du 7^{ème} jour de traitement. Une évolution identique est également notée pour la proportion des groupements HPO_4 apatitique avec une augmentation sensible pour l'échantillon traité 20 jours. La décomposition permet, en outre, de mettre en évidence l'apparition de très faibles quantités d'ions hydroxyle après un jour d'incubation.



IV-10 : Spectres FTIR de l'apatite nanocristalline carbonatée traitée : ANC/KCl et ANC/BP.

Figure

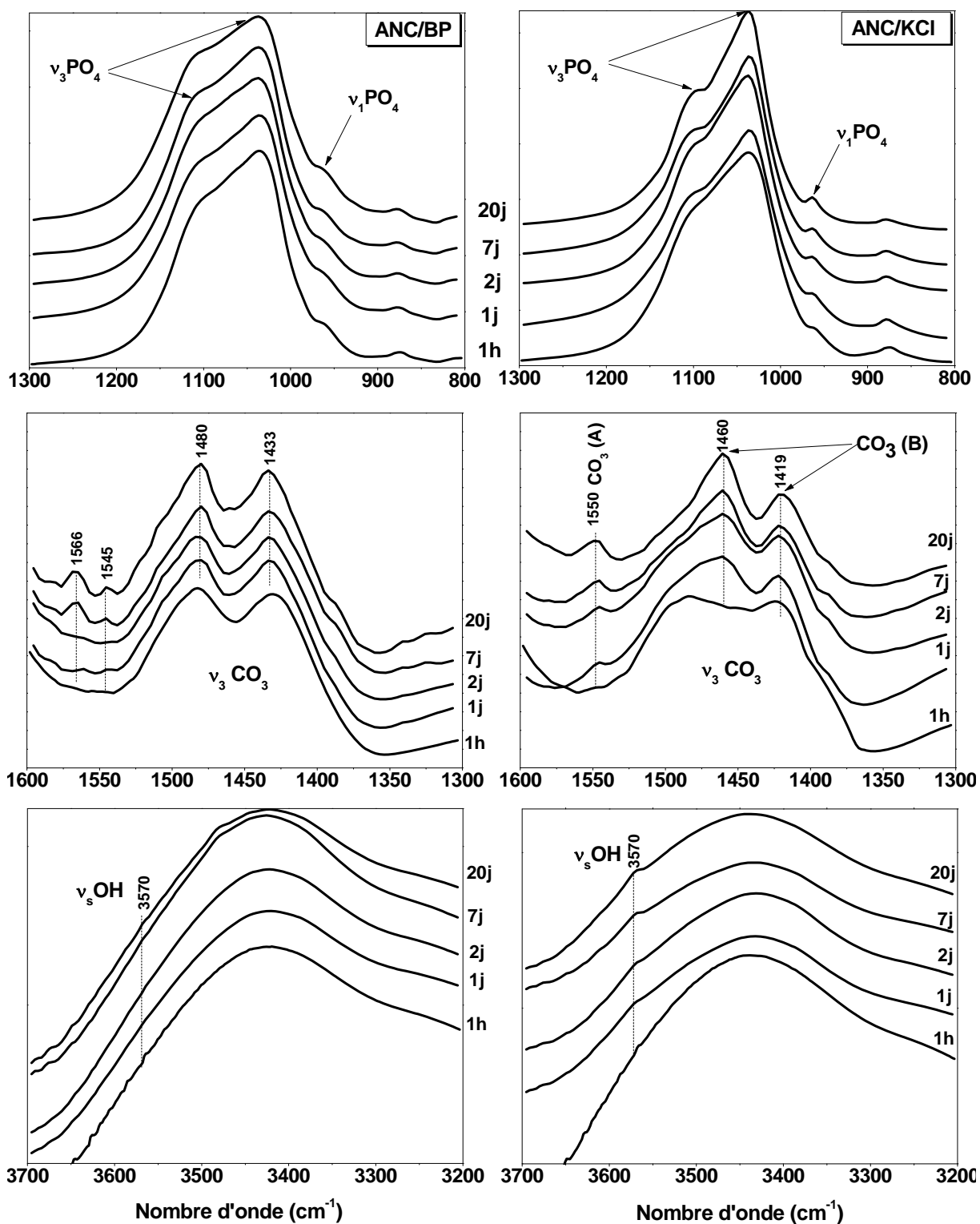


Figure IV-11: Spectres FTIR de l'apatite nanocristalline carbonatée (ANC) traitée en présence de KCl (ANC/KCl) et de risédronate (ANC/BP).

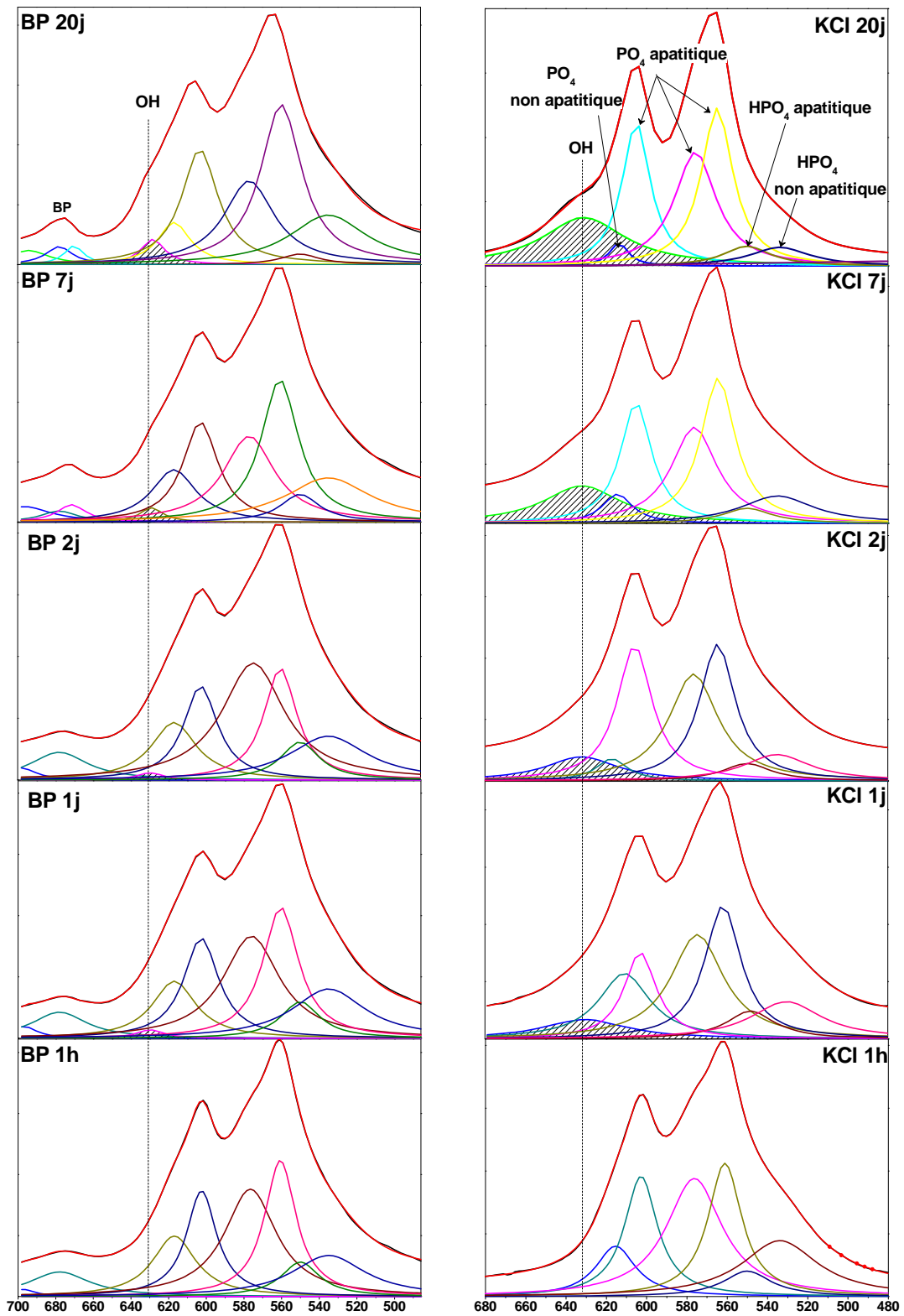


Figure IV-12: Décomposition de la bande phosphate entre 480 et 660 cm^{-1} de ANC maturée dans les milieux KCl (ANC/KCl) et BP (ANC/BP) pour des durées variables (1h à 20j).

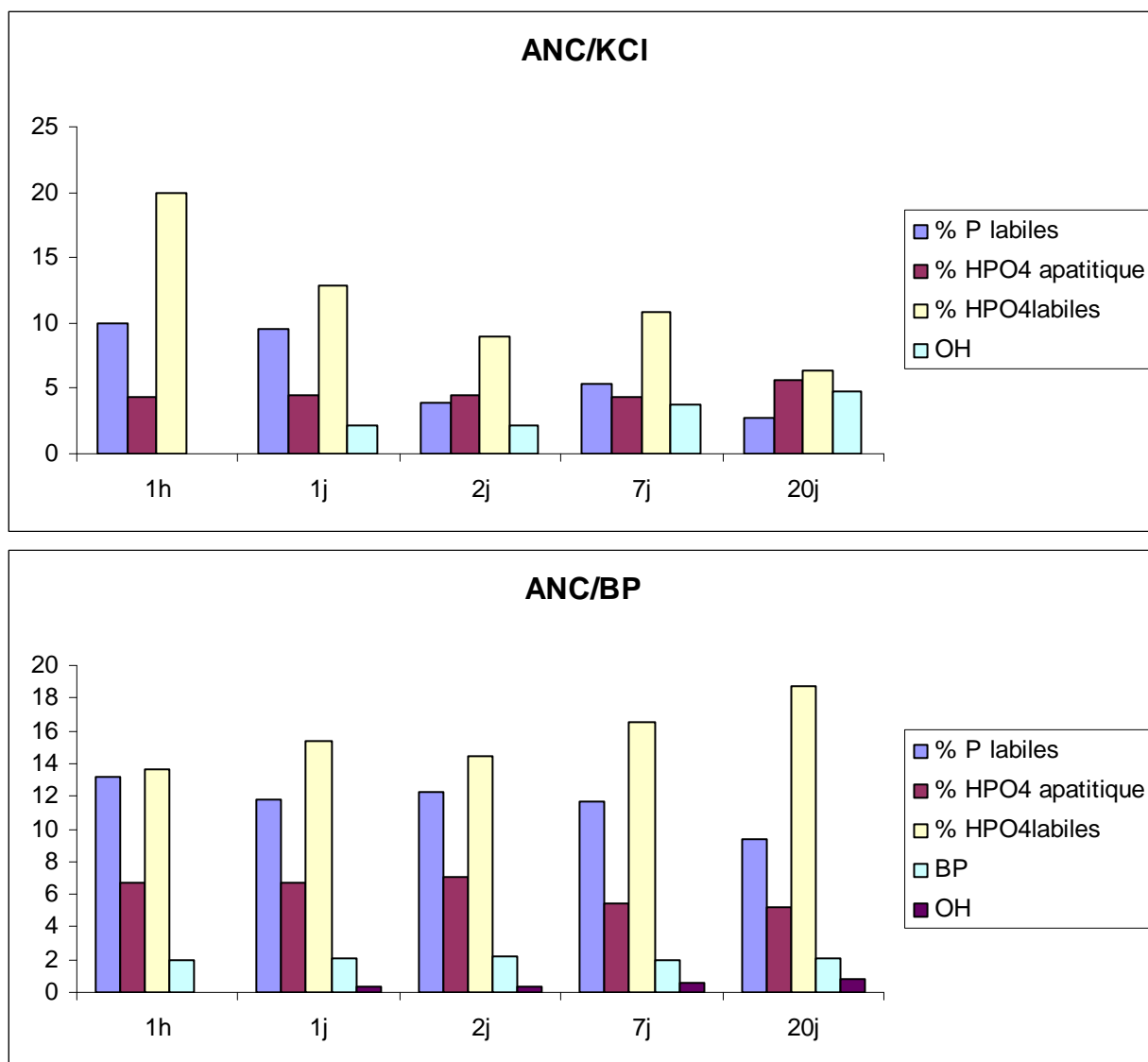


Figure IV-13: Quantités relatives des différentes espèces calculées à partir du rapport des aires des bandes infrarouge pour l'apatite carbonatée traitée dans les milieux KCl (ANC/KCl) et BP (ANC/BP). La teneur en espèces OH et BP représente l'aire totale des bandes correspondantes.

II-4-1-2- Spectrométrie par diffusion Raman

La figure IV-14 regroupe les spectres Raman, obtenus dans la région spectrale située entre 250 et 1750 cm^{-1} , de l'apatite nanocristalline carbonatée (ANC-1j) traitée dans les milieux étudiés (KCl et BP). Aucune modification sensible des bandes d'absorption caractéristiques de l'apatite étudiée ne se manifeste dans le milieu KCl. Par contre, en présence de molécules de risédronate, plusieurs bandes supplémentaires caractéristiques du mode de vibration de groupement pyridine et des liaisons C – P de la molécule se rajoutent sur les spectres Raman obtenus. Ces bandes restent inchangées au cours du traitement (1h à 20j).

Par ailleurs, l'acquisition des spectres Raman dans la région spectrale située entre 3200 et 3600 cm^{-1} pour le support ANC incubé dans KCl (Figure IV-15 a), met clairement en évidence l'apparition de la bande spécifique aux ions hydroxyle (3570 cm^{-1}); l'intensité de cette bande croît avec le durée de traitement. Ceci atteste de l'évolution des cristaux vers une phase apatitique mieux cristallisée, en accord avec les observations révélées par spectrométrie infrarouge. Cependant, les spectres Raman obtenus en présence de risédronate ne subissent aucune altération et confirment l'absence de la bande hydroxyde (Figure IV-15 b). Ces observations corroborent les résultats obtenus par spectrométrie infrarouge et attestent encore une fois de l'effet inhibiteur des molécules fixées à la surface des cristaux sur le processus d'évolution de l'apatite étudiée.

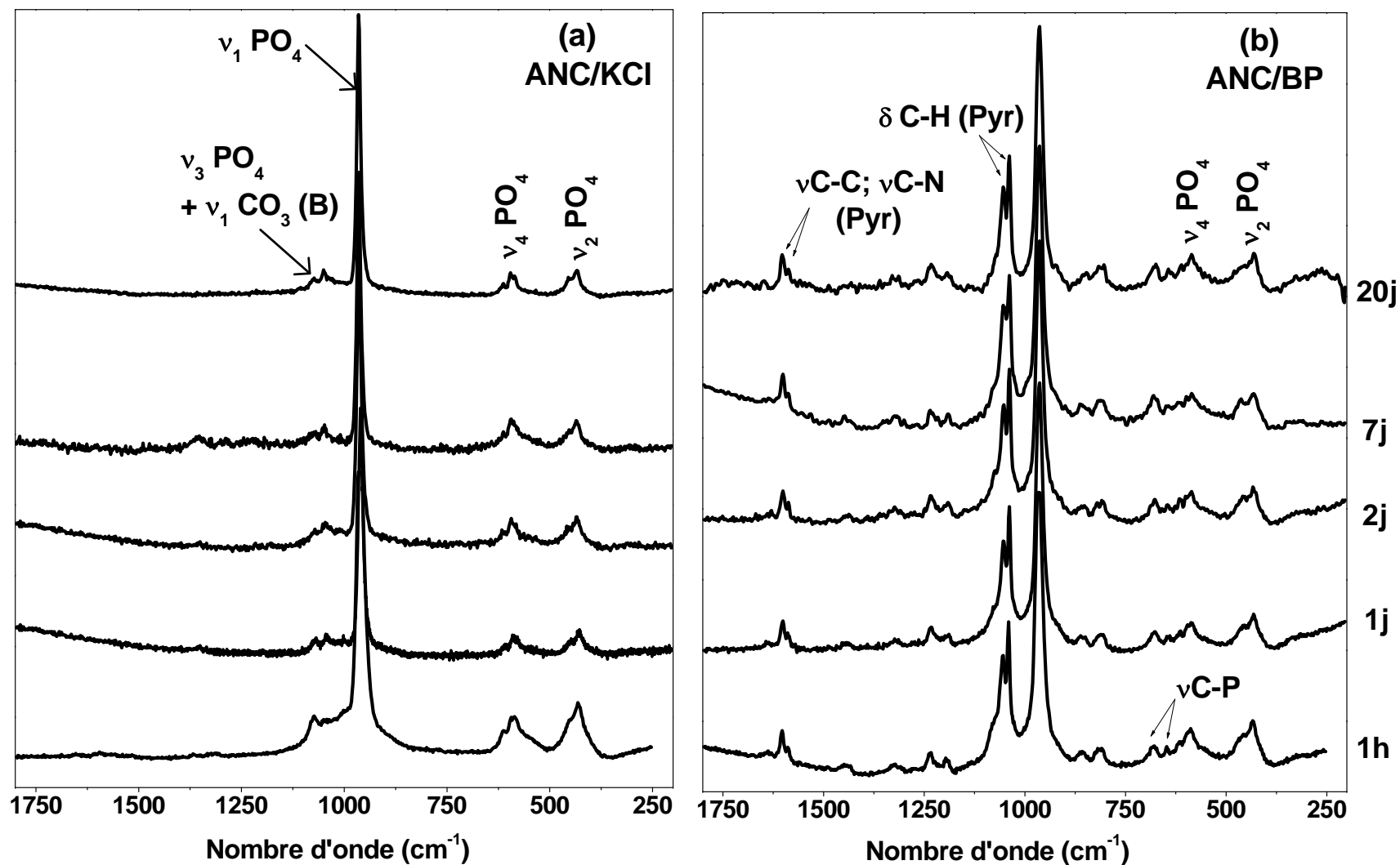


Figure IV-14: Etude par spectroscopie Raman entre 250 et 1750 cm^{-1} de l'évolution à 37°C de ANC (a) dans KCl (b) dans BP: $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$.

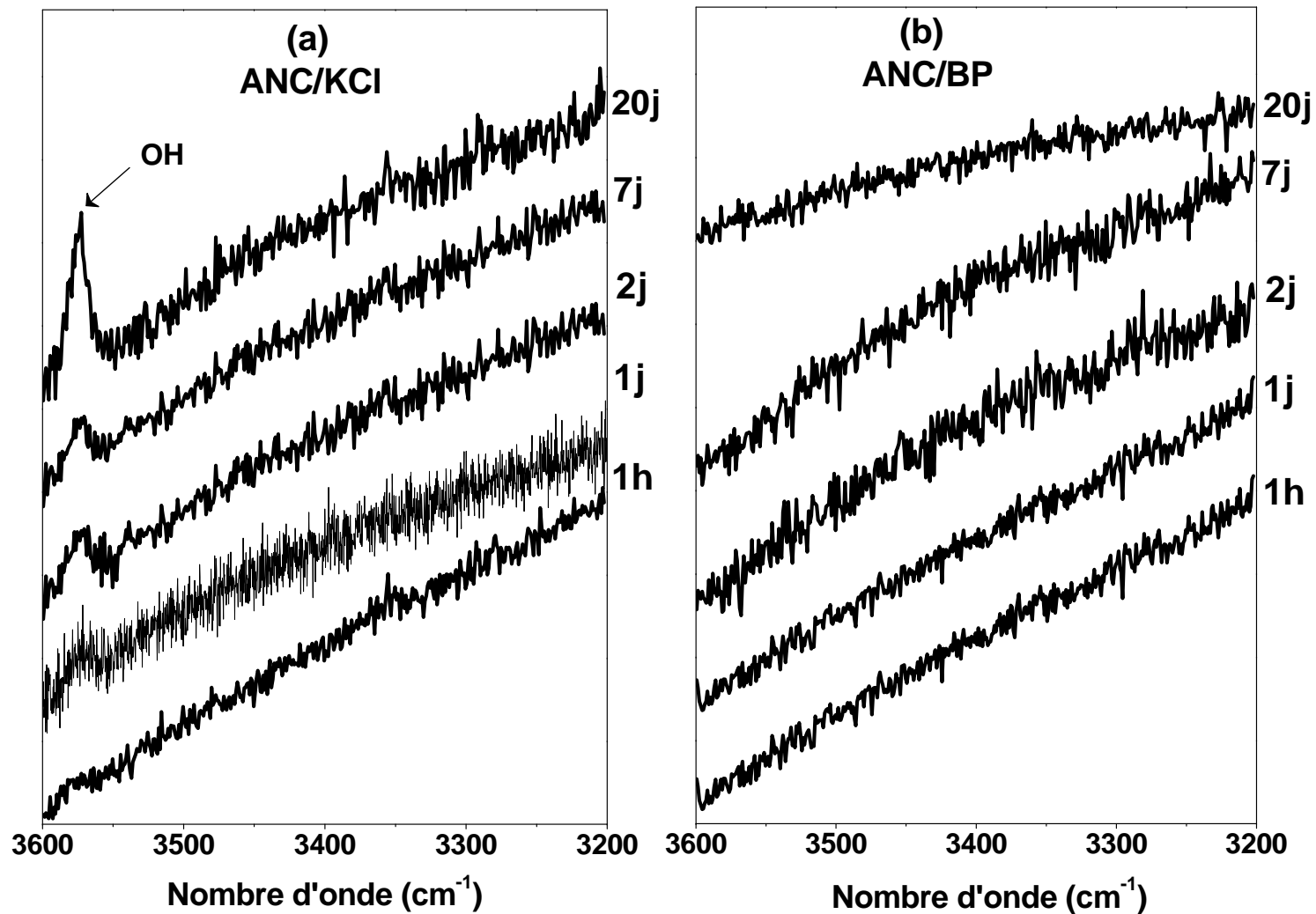


Figure IV-15: Etude par spectroscopie Raman de l'évolution de ANC à 37°C et $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7$ dans: (a) milieu KCl (1 mM) et (b) milieu BP.

III- ADSORPTION DU RISEDRONATE PAR LES APATITES OCTOCALCIQUES

III-1- Matériaux et méthodes

Les solides examinés dans cette étude sont également des phosphates de calcium de synthèse. Il s'agit de phosphate octocalcique apatitique OCPa et du même support carbonaté noté OCPa-c. La préparation ainsi que la caractérisation de ces solides a fait l'objet du second chapitre. Ces adsorbants sont mal cristallisés et présentent des surfaces spécifiques de 49 m²/g et 90 m²/g respectivement pour l'OCPa et l'OCPa-c; ces valeurs sont relativement faibles comparées à celles notées pour les apatites nanocristallines carbonatées obtenues à différents temps de maturation et dont la surface spécifique couvre la gamme 95 - 200 m²/g).

III-1-1- Adsorption

Le protocole expérimental utilisé pour les tests d'adsorption est identique à celui décrit dans le troisième chapitre III. La gamme de concentration explorée varie de 0 à 11,5 mM. Les solutions d'adsorbat ont été fraîchement préparées en dissolvant la quantité appropriée de risédronate (BP) dans une solution de KCl (1 mM). Toutes les expériences ont été réalisées à pH proche de 7,4 et à température voisine de 37°C.

III-2- Résultats

III-2-1- Cinétique d'adsorption

Cette étude a été réalisée avec des solutions d'adsorbat de concentration 1,70 mM. Les cinétiques de rétention du risédronate par les apatites octocalciques examinées montrent que le plateau d'adsorption est atteint durant les premières minutes (20 min) de mise en contact de l'adsorbant et l'adsorbat (Figure IV-16). Des observations similaires ont été notées pour les apatites nanocristallines carbonatées (ANC). Pour la suite de notre étude, nous avons opté pour une durée de contact entre apatite et la solution de risédronate d'environ une heure, temps largement suffisant pour atteindre l'équilibre.

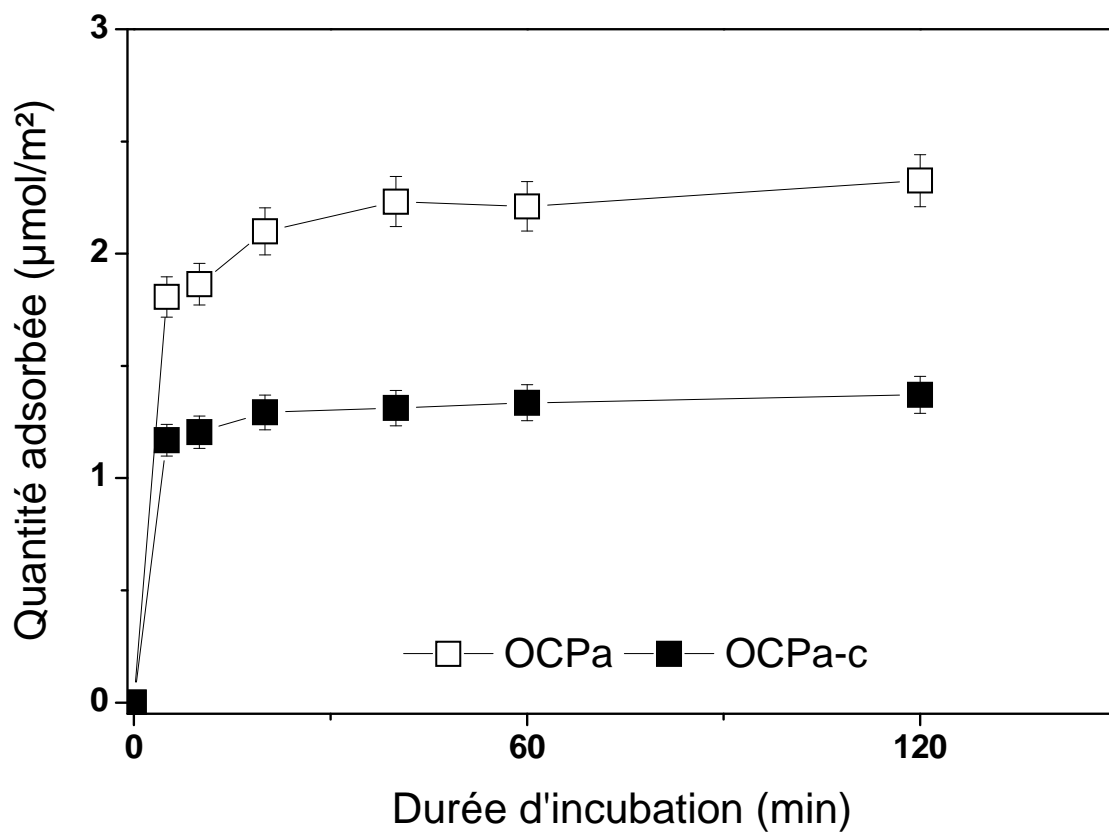


Figure IV-16: Cinétique d'adsorption du risédronate par les supports OCPa et OCPa-c: milieu KCl de $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$ et $T \sim 37^\circ\text{C}$.

III-2-2- Isothermes d'adsorption

Les résultats d'adsorption sur les deux solides examinés (OCPa et OCPa-c) sont représentés dans le tableau IV-7. Un premier examen de ces données montre que, dans les mêmes conditions expérimentales (gamme de concentrations et température), le taux de risédronate fixé par l'OCP apatitique (23 à 93%) est supérieur à celui noté (13 à 91%) pour le solide carbonaté (OCPa-c).

L'évolution de la quantité de risédronate adsorbée en fonction de sa concentration à l'équilibre (Figure IV-17) indique que l'allure des isothermes obtenues est de type Langmuir et que le support carbonaté présente la plus faible affinité adsorbant-adsorbat. En effet, la valeur de la constante d'affinité déduite de l'équation de Langmuir linéarisée pour l'OCPa est environ trois fois plus importante comparée à celle notée pour le support carbonaté (OCPa-c). Cependant, la quantité de molécules de risédronate retenue à la saturation par la surface des phosphates de calcium examinés est pratiquement la même pour les deux supports (Tableau IV-8). Ainsi, les surfaces occupées par les molécules de risédronate sont comparables pour les deux solides examinés et restent proches de celles notées pour les apatites carbonatées de basse cristallinité (ANC).

III-2-3- Influence de l'adsorption sur la composition du milieu

Les résultats d'analyse des solutions obtenues après adsorption du risédronate par les deux supports OCPa et OCPa-c (Tableau IV-9) montrent que la fixation des molécules de risédronate s'accompagne d'une mise en solution d'ions phosphate de manière progressive et en quantité relativement important, alors que les teneurs libérées en ions calcium sont très faibles et ne semblent pas évoluer lors de l'adsorption. Par ailleurs, on note que les quantités en ions minéraux libérées dans le cas de l'OCPa sont plus élevées comparées au support carbonaté (OCPa-c).

L'évolution des ions phosphate en fonction des quantités de risédronate retenues par la surface des phosphates de calcium apatitiques étudiées reste pratiquement linéaire (Figure IV-18). Les pentes de droites ainsi obtenues après linéarisation sont de $1,8 \pm 0,10$ et $1,1 \pm 0,1$ pour les solides OCPa et OCPa-c, respectivement. Cette linéarité atteste d'un processus d'échange ionique impliquant les molécules adsorbées et phosphates libérés; cet échange est plus prononcé dans le cas du phosphate octocalcique apatitique non carbonaté. L'évolution des ions calcium quand à elle reste toujours stable et non monotone en fonction des quantités adsorbées.

Tableau IV-7: Données d'adsorption de risédronate par l'OCPa et l'OCPa-c à T~37°C et pH~ 7,4: Concentration initiale (C_0), concentration à l'équilibre (C_e), quantité fixée (Q) et pourcentage d'adsorption.

OCPa

C_0 (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Ads (%)
0	0	0	0
0,86	0,08	1,59	90,8
1,71	0,54	2,39	68,5
4,28	2,80	3,01	34,5
5,70	4,21	3,05	26,2
8,55	7,03	3,11	17,8
11,40	9,85	3,18	13,7

OCPa-c

C_0 (mM)	C_e (mM)	Q ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Ads (%)
0	0	0	0
0,86	0,06	0,89	93,3
1,71	0,38	1,48	78,0
4,28	2,30	2,19	46,1
5,70	3,48	2,47	39,0
8,55	6,00	2,84	29,9
11,40	8,76	2,94	23,2

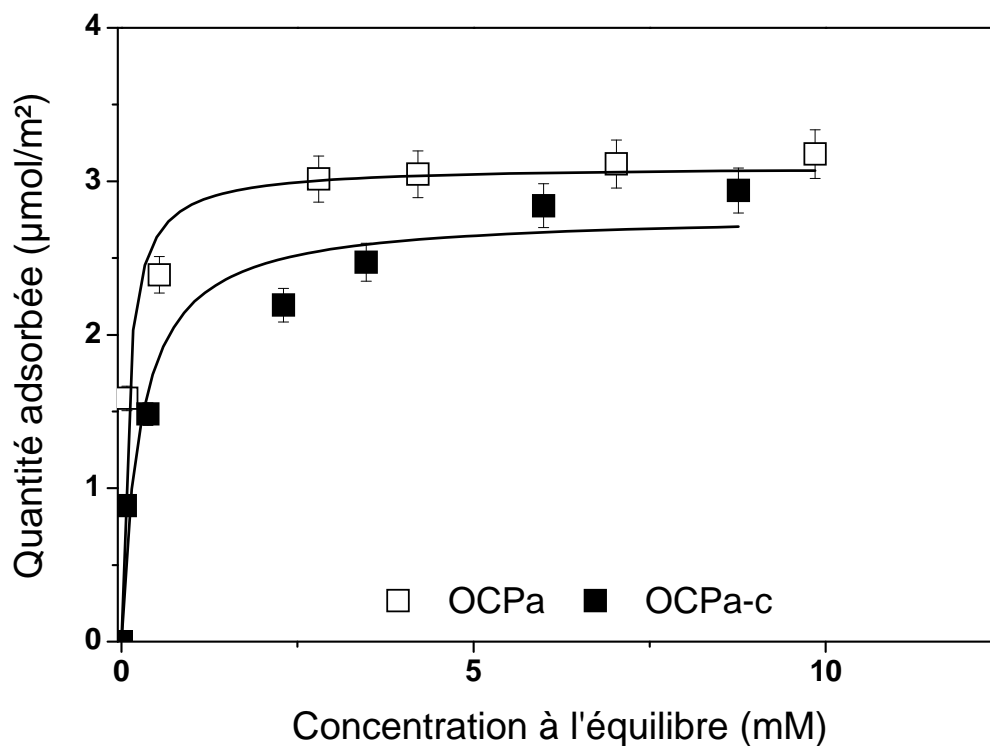


Figure IV-17: Isothermes d'adsorption à 37°C du risédronate par OCPa et OCPa-c: milieu KCl de $pH_{initial} \sim 7,4$.

Tableau IV-8: Paramètres d'adsorption du risédronate par les phosphates octocalciques.

Echantillon	$N \pm \Delta N$ ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	$K \pm \Delta K$ (L/mmol)	δ (nm^2)
OCPa	$3,2 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,6$	0,5
OCPa-c	$3,1 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,6$	0,5

-Tableau IV-9: Composition des solutions après adsorption du risédronate à 37°C par l'OCPa et l'OCPa-c: milieu KCl de pH_{initial} ~ 7,4 et.

OCPa

Q (mM)	P (mM)	Ca (mM)
0	6,22	0,9
0,78	7,50	0,19
1,17	8,06	0,15
1,48	8,55	0,17
1,49	8,83	0,20
1,53	8,91	0,24
1,56	9,07	0,29

OCPa-c

Q (mM)	P (mM)	Ca (mM)
0	0,06	0,04
0,80	0,44	0,02
1,33	1,22	0,04
1,97	2,29	0,09
2,23	2,18	0,06
2,56	2,85	0,11
2,65	2,87	0,12

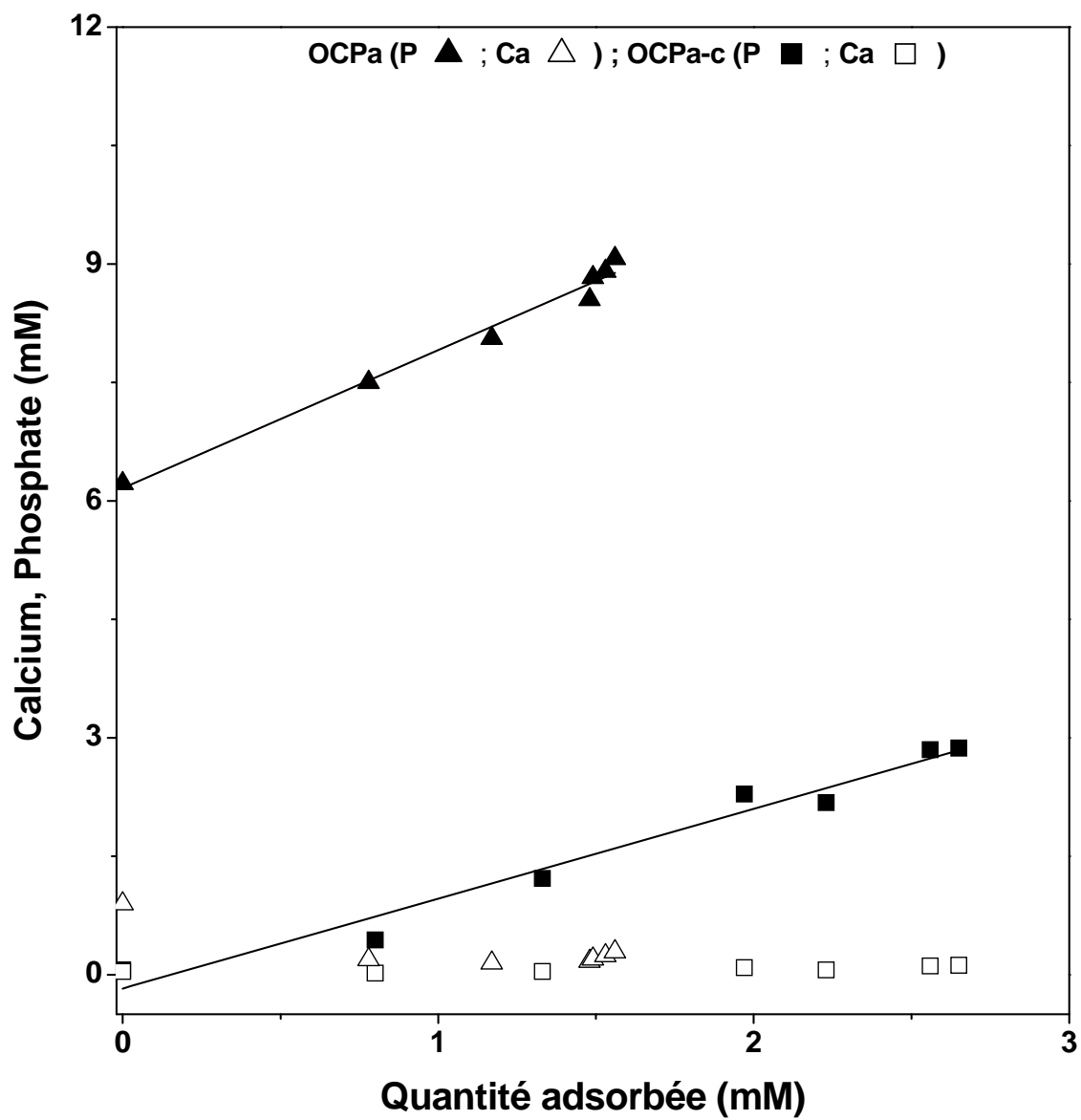


Figure IV-18: Evolution des teneurs en ions phosphate et calcium libérés en fonction des quantités de risédronate adsorbée dans un milieu KCl (1 mM): pH ~ 7,4 et T ~ 37°C.

III-3- Caractérisation du support après adsorption

III-3-1- Conditions expérimentales

Le protocole expérimental adopté est identique à celui utilisé dans le cas des apatites nanocristallines carbonatées examinées dans le présent chapitre (paragraphe II-1). Les échantillons ont été incubés dans des conditions physiologiques ($\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$ et $T \sim 37^\circ\text{C}$) pendant une heure en présence de solutions de risédronate. Les suspensions ont ensuite été centrifugées puis filtrées; les solides ainsi obtenus ont été lavés avec des solutions de KCl (1 mM, $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$) puis lyophilisés durant une nuit. Les échantillons utilisés comme témoins ont été traités dans les mêmes conditions mais sans adsorbat.

III-3-2- Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier

L'étude par spectroscopie d'absorption infrarouge des solides obtenus après adsorption montre, outre les bandes caractéristiques des phosphates de calcium octocalciques de départ (OCPa et OCPa-c), des épaulements dans la région spectrale située entre 650 et 900 cm^{-1} caractéristiques des molécules d'adsorbat (Figure IV-19). Les positions de ces bandes s'identifient à celles notées sur les spectres des sels de calcium de risédronate précipités et sont par contre déplacées par rapport à la molécule native, en particulier celle qui apparaît vers 714 cm^{-1} . Il est à noter par ailleurs que ces bandes sont de faible intensité comparées à celles observées dans le cas des supports ANC examinés antérieurement.

III-3-3- Spectrométrie par diffusion Raman

L'analyse par spectroscopie de diffusion Raman des solides obtenus après adsorption confirme la fixation des molécules de risédronate à la surface des phosphates octocalciques apatitiques examinés (Figure IV-20). En effet, on observe sur les spectres des supports OCPa/BP et OCPa-c/BP des bandes d'absorption caractéristiques des liaisons C-P, de groupements phosphonate et pyridine. Les positions de ces bandes, sont également déplacées par rapport à la molécule native et sont identiques à celles notées sur les sels de calcium élaborés.

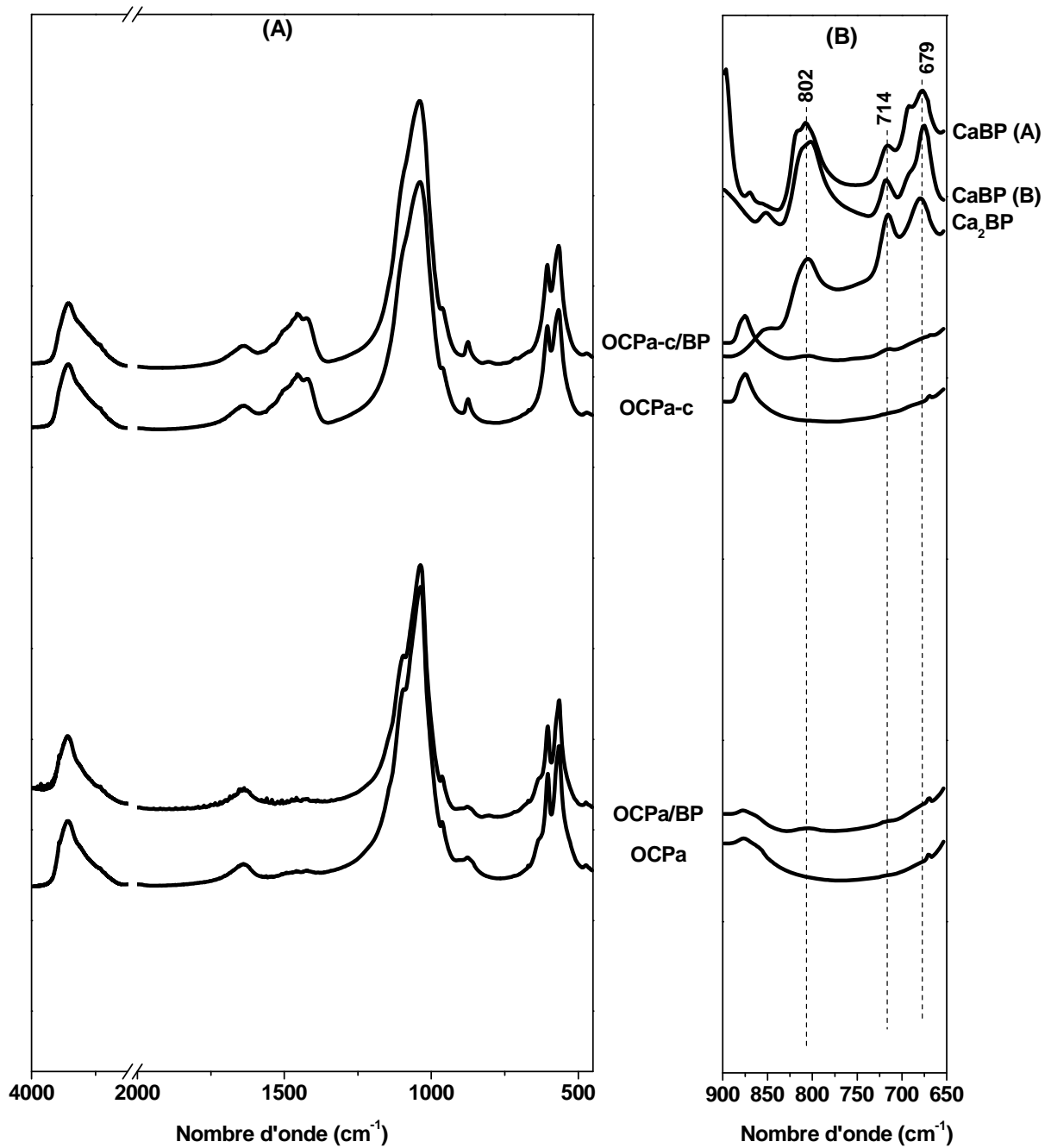


Figure IV-19: Spectres infrarouge de l'OCPa et l'OCPa-c avant adsorption et après contact avec le risédronate (OCPa/BP et OCPa-c/BP) et des sels de risédronate de calcium.

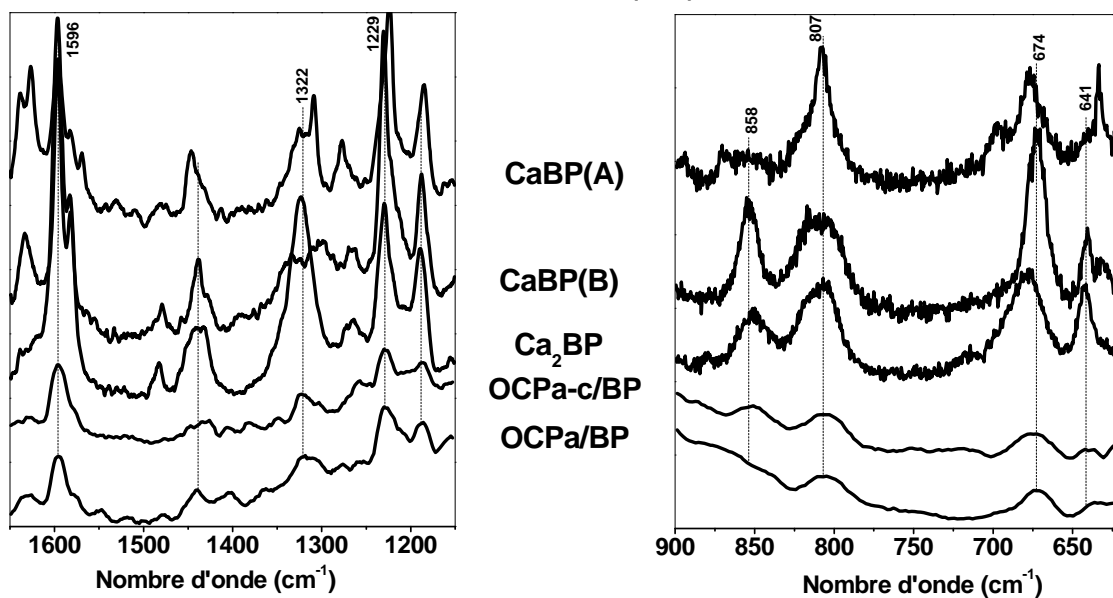
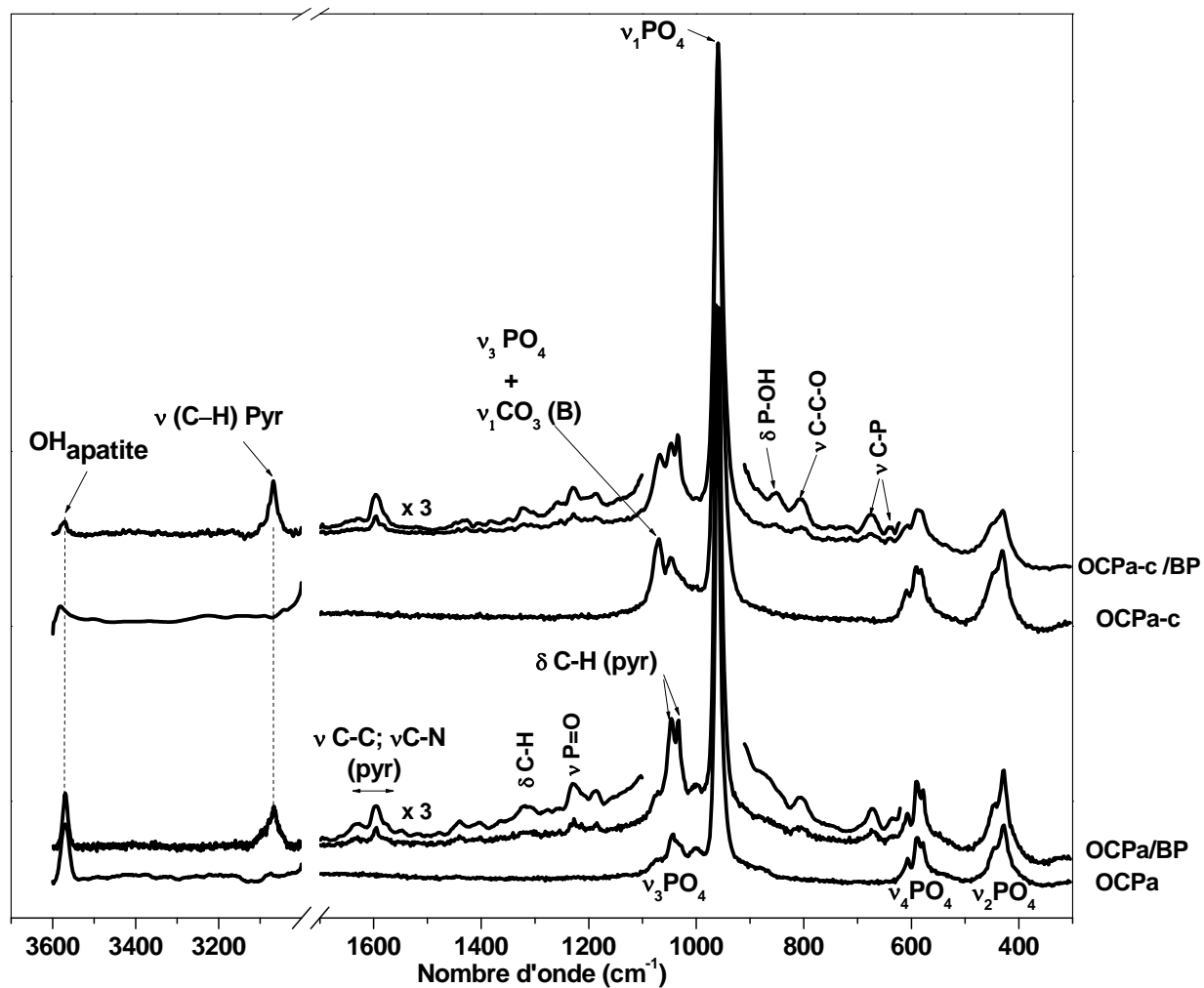


Figure IV-20: Spectres Raman obtenus après adsorption à $T \sim 37^\circ\text{C}$ de BP par les supports OCPa et OCPa-c: milieu KCl (1 mM) de $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$.

IV- DISCUSSION

L'adsorption du risédronate par les apatites nanocristallines carbonatées (ANC) ainsi que les phosphates octocalciques apatitiques (OCPa et OCPa-c) étudiées se produit selon une cinétique rapide. Dans tous les cas, le plateau d'adsorption est atteint durant les premières minutes de mise en contact de l'adsorbant avec l'adsorbat. Cela témoigne de la grande réactivité de surface des solides examinés vis-à-vis des molécules de risédronate. Des observations similaires sont notées pour la réaction de molécules anioniques présentant divers groupement fonctionnels (phosphoserine et BSA) avec la surface de matériaux apatitiques de basse cristallinité (Ouizat et al., 1999; Benaziz et al., 2001). Un processus rapide est également observé pour l'interaction de divers bisphosphonates avec des échantillons de l'os humain (Leu et al., 2006; Mukherjee et al., 2008). Cependant, l'équilibre d'adsorption de l'alendronate (bisphosphonate de troisième génération) par des apatites nanocristallines requiert une durée d'incubation de 24 h (Palazzo et al., 2007). Une vitesse d'adsorption relativement lente (6 h) a également été notée pour l'adsorption de la glycine par des phosphates octocalciques apatitiques (Bennani, 1998). Des cinétiques de quelques heures ou de quelques jours d'incubations sont par ailleurs observées pour l'adsorption de macromolécules anioniques par l'hydroxyapatite (Barroug et al., 1997 et 1998); la lenteur du processus a été attribuée par les auteurs à l'existence de barrière de potentiel que les molécules doivent franchir pour accéder à la surface du matériau, étant donné que les partenaires sont de même signe de charge dans les conditions examinées.

Bien que les caractéristiques des supports examinés (ANC, OCPa et OCPa-c) ainsi que les compositions des solutions utilisées soient différentes, l'adsorption des molécules de risédronate est décrite par des isothermes de type Langmuir. Des allures similaires ont été notées pour l'interaction de phosphates de calcium de basse cristallinité avec des acides aminés (Benaziz, 2002; Bihi et al., 2002) et pour la tetracycline (Bennani, 1998) ainsi que pour la rétention de divers bisphosphonates par des échantillons de l'os humain (Kubíček et al., 2005; Mukherjee et al., 2008).

L'étude comparée de la réactivité des molécules de risédronate vis-à-vis de la surface des phosphates de calcium apatitiques examinés indique que les conditions de synthèse influent considérablement sur les caractéristiques physico-chimiques de ces matériaux et affectent par conséquent leur processus d'adsorption. Les quantités adsorbées ont été rapportées selon le cas à l'unité de masse ou de surface. Cette double présentation offre la possibilité d'exploitation des isothermes d'adsorption. Elle permet, d'une part, de mettre en évidence le rôle des caractéristiques texturales du support et de spécifier, d'autre part, l'importance des sites actifs dans les propriétés de surface de ces matériaux. Il est à noter par ailleurs que la reproductibilité des valeurs

de surfaces spécifiques des supports examinées a été vérifiée moyennant diverses mesures expérimentales.

L'analyse globale des résultats obtenus suggère que divers facteurs sont à prendre en considération pour expliquer la différence de comportement de ces matériaux vis-à-vis des molécules d'adsorbat: composition chimique, état de la surface, taille et morphologie des cristallites.... Si l'on focalise sur la capacité de rétention de ces matériaux en termes de sites actifs on observe que, dans les mêmes conditions expérimentales (pH, température, gamme de concentration, rapport solide-solution...), les apatites nanocristallines (ANC, OCPa et OCPa-c) présentent la plus grande capacité de rétention par unité de surface (Tableau, IV-10) comparées à, l'hydroxyapatite de référence (HA).

Nous avons montré sur la base des techniques spectroscopiques utilisées (chapitre II) que l'une des caractéristiques essentielles des nanocristaux d'apatites synthétisées est la présence à leur surface d'environnements ioniques spécifiques des ions minéraux, appelés "environnements non apatitiques". Ces environnements sont associés à des couches hydratées de surface constituées essentiellement d'ions bivalents très labiles (Ca^{2+} , HPO_4^{2-} et CO_3^{2-}); la teneur de ces espèces dans les apatites de basses cristallinité est d'autant plus importante que la durée de maturation est plus petite. Il a été bien établi que ces environnements sont très instables et disparaissent progressivement sous l'effet de la maturation ou par réaction (Hina, 1996, Cazalbou et al., 2004b; Barroug et al., 2008).

Ainsi, la différence de comportement des apatites de basse cristallinité (ANC) vis-à-vis des molécules d'adsorbat lors de la maturation pourrait être le résultat d'une éventuelle modification de l'état de surface de l'adsorbant. L'évolution de la quantité de risédronate fixée à la saturation par les apatites dans la séquence $\text{ANC-1j} > \text{ANC-6j} \geq \text{ANC-30j}$ suggère que le processus d'adsorption des molécules de risédronate est étroitement lié à la composition de ces domaines non apatitiques et à leur évolution en fonction de la maturation. L'étude d'adsorption menée sur la BSA avec des supports à différents temps de maturation montre des tendances similaires (Ouzat et al., 1999); les auteurs ont montré que les solides fraîchement précipités et non maturés, riches en environnements non-apatitiques labiles, sont les plus actifs et que la capacité de rétention du matériau est réduite avec la maturation. Ce changement en fonction de la durée de maturation se traduit, d'une part, par la formation d'une apatite de moins en moins lacunaire et mieux cristallisée et, d'autre part, par une diminution progressive de la teneur en groupements hydrogénophosphate et phosphate non apatitiques, associée à une augmentation concomitante de phosphates apatitiques et à l'incorporation d'ions

hydroxyle dans le réseau. Ces modifications traduisent une évolution du solide vers la stœchiométrie.

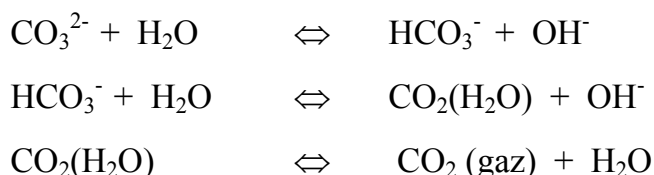
Tableau IV-10: Paramètres d'adsorption à $T \sim 37^{\circ}\text{C}$ du risédronate et caractéristiques physico-chimiques des phosphates de calcium examinés : milieu KCl de $\text{pH}_{\text{initial}} \sim 7,4$.

Echantillon	S_{BET} (m^2/g)	$L_{(002)}-L_{(310)}$ (nm)	$N \pm \Delta N$ ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	$N \pm \Delta N$ ($\mu\text{mol}/\text{g}$)	Ca/P	Ca/(P+C)
ANC-1j	96	24 - 9	$5,9 \pm 1,2$	$0,60 \pm 0,10$	1,53	1,38
ANC-6j	201	30 - 9	$3,2 \pm 0,6$	$0,60 \pm 0,10$	1,59	1,39
ANC-30j	176	35 - 10	$3,1 \pm 0,7$	$0,50 \pm 0,10$	1,61	1,39
OCPa	49	19 - 6	$3,2 \pm 0,1$	$0,16 \pm 0,01$	1,33	-
OCPa-c	90	12 - 4	$3,0 \pm 0,6$	$0,27 \pm 0,01$	1,65	1,38
HA	59	57 - 27	$2,3 \pm 0,1$	$0,13 \pm 0,01$	1,65	1,65

Il est à noter par ailleurs que les phosphates octocalciques apatitiques nanocristallins sont également riches en environnements labiles et présentent des quantités adsorbées à la saturation comparables à celles notées pour les échantillons ANC-6j et ANC-30j. Cette similitude de réactivité entre phosphate octocalcique apatitique et apatites nanocristallines a été également observée pour l'interaction de la phosphoserine avec ces supports (Benaziz, 2002).

L'analyse de la composition de la solution après adsorption révèle que la fixation de molécules de risédronate se traduit par une modification de la teneur en ions minéraux en solution: on assiste à la mise graduelle en solution d'ions phosphate avec la quantité de risédronate fixée. Par ailleurs, la capacité d'adsorption des supports est accrue par la présence d'environnements labiles à la surface des nanocristaux apatitiques. L'évolution linéaire des ions phosphate libérés en solution au cours de l'adsorption montre que la fixation des molécules d'adsorbat se fait principalement selon un processus d'échange ionique impliquant les espèces phosphates et risédronates, qui pourraient partager les mêmes sites d'adsorption à la surface du solide. Des résultats similaires ont été notés pour l'interaction de divers acides bisphosphoniques avec l'os humain (Mukherjee et al., 2008 et 2009) et avec des apatites déficientes en calcium (Roussière et al., 2005). La présence d'ions carbonate labiles à la surface des apatites préparées et la corrélation avec la quantité adsorbée suggère que ces espèces pourraient bien contribuer à ce processus d'échange ionique à

l'interface du matériau et son milieu environnant; toutefois nous n'avons pas procédé dans le cadre de ce travail à l'analyse de ces espèces en solution afin d'illustrer ce phénomène. En effet le contenu en ions carbonate de solutions à pH neutre peut facilement être altéré au cours de la filtration en raison des équilibres acide-base de ces ions en solution :



Sur la base des données d'adsorption obtenues avec les apatites nanocristallines, il semblerait que la mobilité des espèces ioniques non apatitiques à la surface des nanocristaux affecte considérablement le processus d'échange ionique ainsi décrit. La corrélation établie entre les teneurs en environnements labiles et quantités adsorbées à la saturation par les apatites examinées illustre bien ce phénomène (Figure IV-22). Il apparaît clairement que l'évolution des quantités de bisphosphates adsorbés est étroitement liée à la teneur en ions hydrogénophosphate et carbonate non apatitiques. En effet, l'apatite maturée un jour et dont la surface est riche en espèces labiles, offre une capacité d'échange ionique plus importante comparée aux supports vieillis durant 6 et 30 jours dans leurs solutions mères.

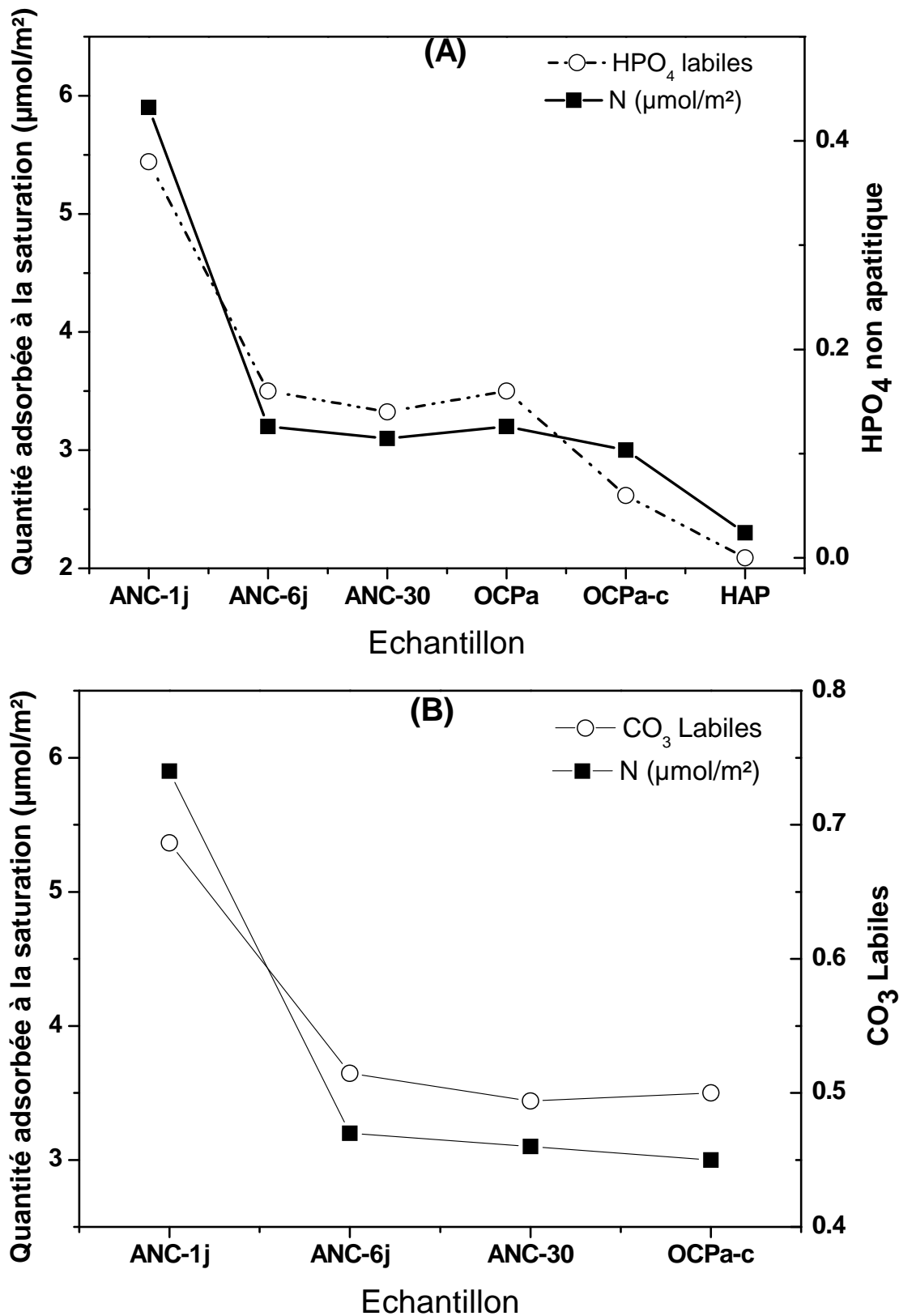


Figure IV-22: Corrélation entre risédronates adsorbés et teneurs en groupements phosphate (A) et carbonate labiles non apatitiques (B).

Nous avons montré que la présence d'environnements labiles riches en espèces ioniques à la surface des analogues du minéral osseux leur confère une grande réactivité. Toutefois, ces espèces non présentes dans le cas des solides bien cristallisés, ne peuvent être seules responsables du phénomène d'adsorption. D'autres facteurs sont également à prendre en considération dans la réactivité de ces matériaux, en particulier les propriétés microstructurales des supports examinés. Ainsi, l'apatite de référence (HA), bien cristallisée et formée de cristallites de dimensions relativement importantes (Tableau IV-10), présente la plus faible capacité de rétention de risédronate par unité de surface, tandis qu'une quantité plus importante est notée pour les échantillons présentant des cristallites d'une dizaine de nanomètres. Ces observations indiquent que l'état finement divisé ainsi que les irrégularités de surface des phosphates de calcium mal cristallisés (ANC-1j, ANC-6j, ANC-30j, OCPa et OCPa-c) sont également des facteurs déterminant dans leur réactivité. Les mêmes constatations ont été rapportées pour divers adsorbats avec des apatites de microstructures différentes (Ouizat, 2000; Benaziz, 2002; Matsumoto et al., 2003, Barroug et al., 2004).

L'analyse systématique de surface des solides issues des expériences d'adsorption par l'intermédiaire de différentes techniques de caractérisation physico-chimiques constitue le second volet de notre approche expérimentale. Les spectres de DRX réalisés sur les poudres obtenues après contact avec les molécules de risédronate (ANC/BP) ne montrent aucune phase étrangère outre que l'apatite. Toutefois, la formation d'une telle phase à la surface des nanocristaux ne peut être écartée dans la mesure où elle serait de nature amorphe. Les études cristallographiques menées sur des apatites synthétisées en présence d'un autre bisphosphonate (alendronate) appuient cette hypothèse (Bonanini et al., 2007); en effet, le produit issu de la réaction est un phosphate de calcium apatitique (hydroxyapatite) associé à une phase amorphe d'alendronate de calcium.

Les résultats dégagés de l'étude menée par spectrométries FTIR et Raman confirment l'immobilisation des molécules de risédronate à la surface des solides examinés. En effet, les spectres obtenus montrent, en plus des raies caractéristiques des supports apatitiques examinés, des raies spécifiques des modes de vibration des groupements fonctionnels des molécules de risédronate adsorbées. Les positions de ces bandes sont déplacées par rapport à la molécule native et s'apparentent par ailleurs à celles observées dans les sels de calcium de risédronate précipités (Tableau IV-11). Les déplacements ainsi notés au niveau des positions de bandes pour les molécules fixées traduisent l'existence d'interactions relativement fortes impliquant les groupements fonctionnels de ces espèces et les sites actifs à la surface du support apatitique. Des observations similaires ont été notées pour la fixation du clodronate

(BP) à la surface de biocéramiques d'apatite (Luo et al., 2008), du phénylphosphonate à la surface de l'hydroxyapatite (Aissa et al., 2007), de la phosphoserine par divers phosphates de calcium (Benaziz, 2002). Les mêmes tendances ont été rapportées pour l'adsorption de l'acide octadécylphosphonique par l'émail dentaire (D'andrea et al., 2003) et le zolédronate par des échantillons de fémur de rats (Juillard et al., 2010).

Par ailleurs, la similitude entre les positions des bandes de molécules adsorbées avec celles des sels de risédronate de calcium précipités laisse penser qu'il s'agit du même type d'interaction. Le déplacement observé par Raman au niveau des fréquences des bandes de vibrations des molécules de risédronate adsorbées, et plus spécialement celles du noyau de pyridine ($\Delta\nu \sim 41 \text{ cm}^{-1}$) et des groupements phosphonate ($\Delta\nu \sim 7 \text{ cm}^{-1}$) ainsi que des liaisons C-P ($\Delta\nu \sim 17 \text{ cm}^{-1}$), traduit l'altération de l'environnement moléculaire de l'adsorbat. Ces modifications chimiques pourraient être la conséquence d'interactions mettant en jeu les groupements fonctionnels des bisphosphonates (phosphonates) et les sites actifs à la surface des solides (ions calcium).

Nous avons en outre mentionné que dans certaines conditions expérimentales (domaine de concentrations relativement élevées) les phénomènes physico-chimiques qui interviennent à la surface du matériau apatitique sont plus complexes qu'un simple processus d'échange. La mise en solution des ions minéraux suite à la dissolution des cristaux apatitiques et leur évolution avec la quantité de risédronate fixée appuient l'hypothèse de la formation de complexes de calcium soluble ou de paires d'ions impliquant les molécules de risédronate. De ce fait, la possibilité de formation de sels insolubles de risédronate de calcium à la surface de l'apatite ne peut être écartée et doit être considérée comme une réaction compétitive de l'adsorption. Il est à noter cependant que de telles réactions de déplacement avec la formation d'un risédronate de calcium sous forme de phase séparée doivent être exclues. En effet dans ce cas la réaction ne serait pas limitée et se poursuivrait avec l'addition de risédronate.

Tableau IV-11: Attributions des principales bandes de vibrations observées dans les spectres Raman du risédronate monosodique (BP), des sels de risédronate de calcium précipités (CaBP(A), CaBP (B) et Ca2BP) et des apatites obtenues après adsorption (HA/BP, ANC/BP, OCPa/BP et OCPa-c/BP).

F: Forte, tF: très forte, m: moyenne, f, faible, tf: très faible, ép: épaulement).

a: Socrates, 2004; b: Cukrowski et al., 2007; c: Juillard et al., 2010

Attributions	BP ^{a,b,c}	Ca ₂ BP	CaBP(A)	CaBP(B)	HA/ BP	ANC/BP	OCPa/BP	OCPa-c /BP
δ C – C	276 tf	-	-					
	320 tf	324 ép	-					
ν C – P	629 m	642 m	642 tf	642 f	642 tf	646 f	634 tf	641 tf
	661 m	677 m	633 m	633 f	673 tf	677 f	672 f	674 f
ν C – C – O	823 tf	807 m	807m	807 m		808 f	807 f	807
δ (P – OH)	862 m	849 f	-	855 m		858 f		858 f
ν_s P – OH	932 tf, 970 m, 1033 ép	914 ép, 967 m	959 f -	923 f, 965 m				
δ (C – H) pyr	1024F, 1054 F	1034 t F, 1048 F	1033 F, 1050 tF	1031 tF, 1048 tF		1040 m, 1053 m	1032 m, 1045m	1034 m, 1046m
ν P=O/ δ^{II} POH	1222 m	1229 m	1223 m	1229 m	1227 tf	1234 f	1229 f	1229 f
δ (C – H)	1315 m	1325 m	1323 ép	-	1319 f	1321 tf	1320 f	1322 f
ν (C=N),	1445 tf	1439 tf	1445 tf	1439 tf	1445 tf	1444 tf	1440 f	1440 f
	1569 f	-	-	-				
ν (C=C) pyridine	1625 ép	1582 tf	1581 tf	1581 tf	1582 tf	1588 f	1578 tf	
	1637 m	1596 m	1596 f	1596 m	1596 m	1603 m	1596 m	1596 m

L'étude par RMN de l'état solide des adsorbants examinés (ANC/BP et HA/BP) confirme les observations faites par les techniques spectroscopiques (FTIR et Raman) et par analyse chimique en solution quant au mode d'interaction se produisant à l'interface de l'apatite et son milieu environnant. En effet, la présence de massif large et intense vers 18 ppm dans le spectre ^{31}P CP MAS (Figure IV-23) de l'apatite nanocristalline traitée en présence de risédronate (ANC/BP) est indicative non seulement d'interactions fortes survenant à l'interface ANC-risédronate, mais atteste aussi d'un changement significatif de l'environnement local des noyaux de phosphore des groupements phosphonate. En outre, l'analyse par RMN dans les mêmes conditions expérimentales (température, gamme de concentration, pH) corrobore la grande réactivité notée pour les supports nanocristallins comparés à l'apatite de référence (HA/BP).

Par ailleurs, l'allure large et dissymétrique du pic additionnel noté pour ANC/BP traduit l'état de mauvaise cristallinité des espèces adsorbées. Les mêmes phénomènes ont été rapportés pour diverses molécules de bisphosphonates adsorbées par des apatites phosphocalciques (Grossmann et al., 2000; Roussière et al., 2005), apatites déficientes en calcium (Roussière et al., 2005) et par des échantillons de l'os humain (Mukherjee et al., 2008). La similitude du pic additionnel avec celui du composé amorphe précipité (Ca_2BP) suggère la présence de ce sel dans la monocouche formée à la surface de l'apatite nanocristalline. Dans notre cas, la précipitation de sels insolubles de risédronate de calcium à la surface de l'apatite n'a pu être observée par diffraction des rayons X, étant donné leur caractère amorphe. Cependant, Cukrowski et al. (2007) affirment sur la base de résultats issus de la combinaison de différentes techniques (Raman, RMN, DRX et MEB) la formation de complexes à la surface de l'hydroxyapatite et de l'os bovin traités par des solutions d'etidronate. La formation d'un précipité cristallin à la surface de l'hydroxyapatite et de l'os de rat a également été rapportée dans l'étude menée par Raman et MEB (Juillard et al., 2010) sur la réactivité de ces matériaux avec le zolédronate. La précipitation de telles phases a aussi été observée par RMN du solide et MEB lors d'interaction de zolédronate et de tiludronate avec des phosphates tricalciques β (Josse, 2003; Roussière et al., 2008).

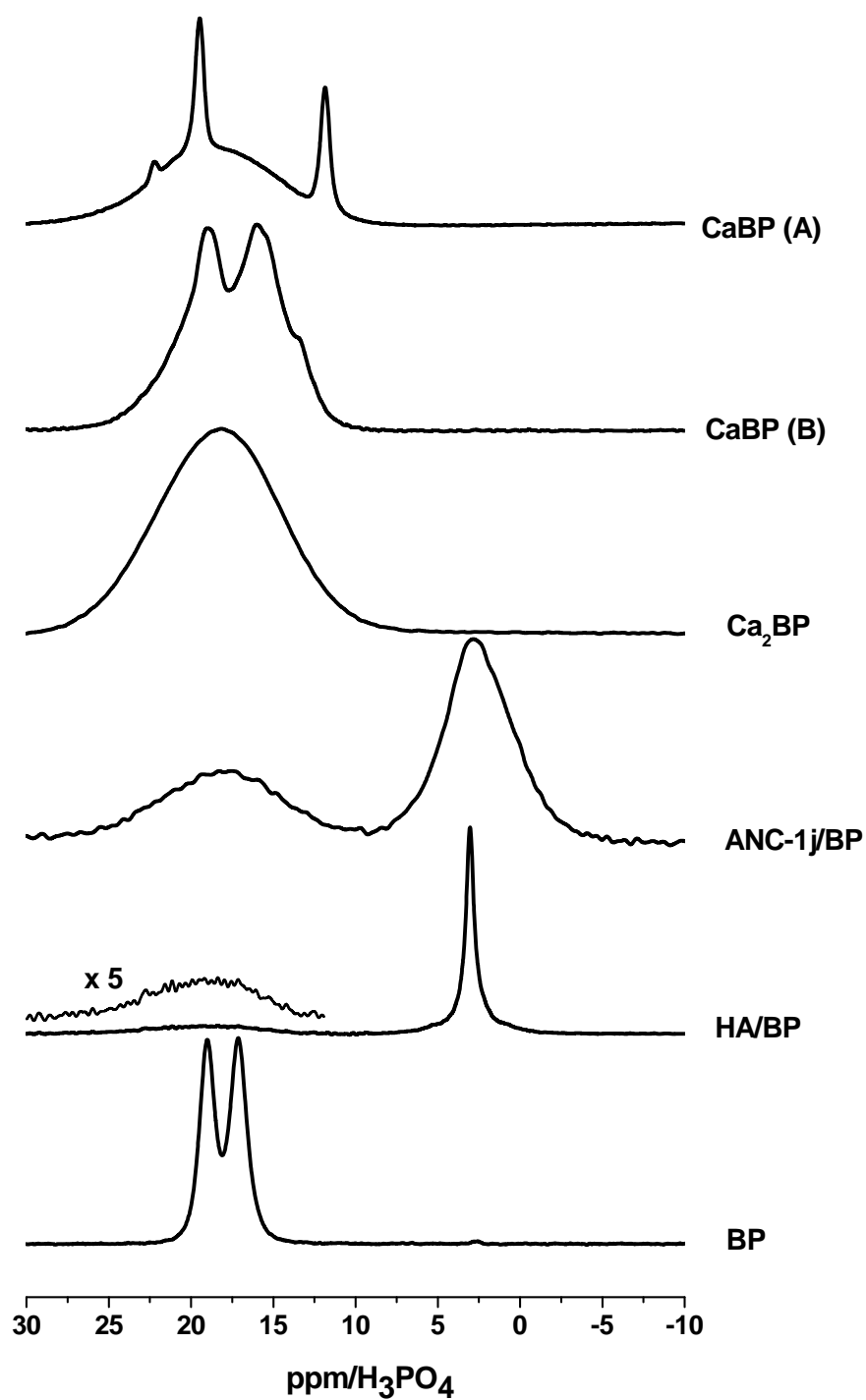


Figure IV-23: Spectres RMN $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP MAS (temps de contact = 5ms) du risédronate seul (BP), des supports après adsorption (HA/BP, ANC-1j/BP), et des sels de calcium synthétisés (CaBP(A), CaBP (B) et Ca₂BP).

L'étude menée sur l'incubation des nanoapatites carbonatées (ANC) en absence et en présence de molécules de risédronate visait à spécifier le rôle de ces espèces sur l'évolution des caractéristiques physico-chimiques de ces matériaux. L'analyse des spectres infrarouges et Raman des cristaux apatitiques traités en présence de l'électrolyte chlorure de potassium (ANC/KCl) révèle une amélioration accrue de la cristallinité en fonction du temps d'incubation; l'apparition des ions hydroxyle en proportion relativement importante et la diminution de la teneur des ions phosphate non apatitiques attestent du phénomène observé. Cependant, une tendance inverse se manifeste lors de l'incubation des cristaux dans le même milieu additionné de molécule de risédronates (ANC/BP). En effet, la spectroscopie FTIR ne révèle aucune évolution significative dans les proportions des différentes espèces phosphate dans les conditions expérimentales adoptées. En outre, aucune bande de vibrations relatives aux groupements hydroxyle ne figure sur les spectres Raman (ANC/BP) des supports traités. Ces observations laissent penser que la fixation des molécules de risédronate à la surface de l'apatite nanocristalline inhibe l'évolution des cristaux vers un état de cristallinité meilleure.

La différence de comportement notée en présence et en absence des molécules BP peut être essentiellement liée au mode de fixation de ces espèces à la surface des nanocristaux. En fait, l'adsorption semble altérer et/ou ralentir le processus de restructuration de la couche hydratée et son évolution vers des formes plus stables. Cet effet inhibiteur a été observé lors du traitement d'apatites nanocristallines en présence d'ions magnésium (Mg^{2+}) et carbonate CO_3^{2-} (Hina, 1996; Cazalbou, 2000; Eichert, 2002). La localisation de ces ions dans la couche hydratée conduit à une stabilisation des environnements non apatitiques, gênant ainsi la progression vers des domaines apatitiques stables.

L'absence d'évolution dans notre cas pourrait être la conséquence de l'adsorption des espèces BP à la surface des nanocristaux. Ainsi la fixation du risédronate est étroitement liée à la composition des domaines non apatitiques à la surface de ces matériaux. Cette surface instable est éventuellement le siège de divers phénomènes dépendant les uns des autres: échange ionique, dissolution, complexation et/ou précipitation de sel de risédronate de calcium. Ces observations une fois de plus semblent indiquer une interaction étroite entre molécules adsorbées et la surface de la phase apatitique et semblent exclure, dans notre cas, la formation d'une phase séparée. Ces processus complexes peuvent altérer considérablement la redistribution des groupements labiles, bloquant ainsi les sites actifs à la surface des nanocristaux, ce qui ralentit leur évolution vers des phases apatitiques plus stables. Ces observations

corroborent les recherches menées in vitro sur la nucléation et la croissance cristalline de phosphate de calcium en présence de molécules organiques. Il a été rapporté que l'effet inhibiteur des pyrophosphates, bisphosphonates et polyphosphonates sur le taux de croissance cristalline de l'hydroxyapatite est principalement dû à leur complexation avec les ions calcium situés au niveau des nœuds et des zones de dislocation de la surface des cristaux (Fleisch et al., 1970; Russell et al., 1970; Meyer et Nancollas, 1973). En outre, le rôle inhibiteur ou promoteur sur la nucléation et la croissance cristalline de phosphate de calcium en présence d'ostéopontine (Boskey et al., 1993), de protéoglycanes et phosphoprotéines (Termine et al., 1980; Linde et al., 1989;), et de l'albumine de sérum bovin (Combes et Rey, 2002) a été principalement attribué, selon la concentration, aux phénomènes d'adsorption.

V- INTERACTION PHOSPHATES DE CALCIUM-BISPHOSPHONATES ET CONSEQUENCES BIOLOGIQUES

La nature physico-chimique de l'interaction entre bisphosphonate et phosphate de calcium analogues au minéral osseux, établie dans le cadre de ce travail, peut avoir des conséquences sur le plan biologique. Toutefois, l'extrapolation des résultats issus d'une étude *in vitro* menée sur un système relativement simple dans un milieu vivant dans lequel les phénomènes qui se produisent sont complexes doit être faite avec précaution.

Nous avons mentionné précédemment que le mécanisme d'inhibition des minéralisations normales ou ectopiques par les bisphosphonates est principalement dû à un mécanisme physico-chimique (Fleisch, 1998). En effet, il existe une relation étroite entre la capacité d'une molécule de bisphosphonate à inhiber la croissance cristalline des phosphates de calcium *in vitro* et de son efficacité sur la calcification *in vivo* (Trechsel et al., 1977; Van Beek et al., 1994).

Les effets physico-chimiques de la plupart des bisphosphonates sont très semblables à ceux de pyrophosphate. Ainsi, ils inhibent la formation, l'agrégation des cristaux de phosphate de calcium, bloquent la transformation de phosphate de calcium amorphe en hydroxyapatite, et retardent l'agrégation des cristaux d'apatite (Fleisch, 1998).

Tous ces effets semblent être liés à l'affinité marquée de ces composés pour la surface de la phase phosphocalcique, à la surface duquel ils se fixent fortement (Jung et al., 1973). Cette affinité est due aux fortes interactions entre groupements fonctionnels des BPs et sites calcium. Il a été suggéré que les BPs peuvent former des liaisons bidentales ou tridentales avec les ions calcium à la surface des cristaux d'apatites (Nanacollas et al., 2006). La coordination bidentale implique un atome d'oxygène de chaque groupement phosphonate. C'est le cas de la molécule de Clodronate. Tandis que la plupart de bisphosphonates utilisés actuellement dans le traitement des pathologies osseuses se fixent au calcium d'une manière tridentale, faisant ainsi intervenir l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle (R1) lié au carbone centrale. Ainsi il semble que la présence d'un groupement hydroxyle en position R1 augmente l'affinité des bisphosphonates pour le calcium; ils se comportent alors comme ligands tridentales (Nanacollas et al., 2006). Dans le cas du risédronate nous avons pu confirmer par les différentes techniques utilisées la forte implication des groupements phosphonate dans l'interaction avec les ions calcium à la surface des apatites examinées.

Il a été rapporté par ailleurs, sur la base de mesures électrocinétiques, que l'adsorption de plusieurs bisphosphonates par l'hydroxyapatite induit un changement

significatif de leur charge globale de surface (Nancollas et al., 2006). Cette charge peut affecter in vivo plusieurs propriétés du minéral osseux, tels l'habilité à attirer d'autres ions, molécules chargées et macromolécules ou éventuellement des cellules osseuses telles les ostéoclastes ou les ostéoblastes. Cette charge peut aussi affecter la fixation locale d'autres bisphosphonates ajoutés, par attraction ou répulsion selon leur signe de charge.

La tension interfaciale est également un facteur à prendre en considération pour expliquer l'effet inhibiteur des bisphosphonates sur la croissance cristalline du minéral osseux. Ce paramètre joue un rôle important non seulement dans la stabilité des suspensions colloïdales et l'adsorption de molécules à l'interface solide/solution mais aussi dans la description classique de la nature et la cinétique de la croissance cristalline (Wu et Nancollas, 1999). Ainsi, l'adsorption de bisphosphonates par l'hydroxyapatite provoque une nette diminution de la tension interfaciale, ce qui affecte considérablement le processus de nucléation et de croissance cristalline du minéral apatitique.

Les bisphosphonates peuvent aussi altérer le processus de vieillissement du minéral osseux. Cette propriété de maturation, liée essentiellement à la présence d'une couche hydratée très instable à la surface, est très affectée par les phénomènes d'adsorption. Nous avons montré par l'intermédiaire des techniques spectroscopiques (FTIR et le Raman) que la fixation des molécules de risédronate à la surface des nanocristaux apatitiques bloque leur évolution vers un meilleur état de cristallinité. La localisation de ces molécules dans la couche hydratée semble gêner sa restructuration en apatite et donc préserver sa réactivité de surface. Dans les milieux vivants la fixation préférentielle des bisphosphonates au niveau de l'os spongieux, qui est le mieux irrigué par le sang, pourrait participer en plus du remodelage osseux au processus de régénération de la couche hydratée.

Un autre aspect des bisphosphonates est leur effet à long terme même après l'interruption du traitement. Par la réaction d'échange ionique proposé dans cette étude, nous avons illustré la grande habilité du risédronate à s'échanger avec les groupements phosphate de la surface de l'apatite. La capacité des ions phosphate à déplacer les molécules de risédronate adsorbées a été aussi prouvée. Cependant, in vivo les molécules de BPs adsorbées sur l'os ne peuvent être détachées par l'action inverse des ions phosphate et/ou d'autres espèces compétitives aux sites d'adsorption. Vu les faibles variations circadiennes des ions phosphate dans les fluides biologiques, les bisphosphonates adsorbées ne peuvent pas se libérer d'une façon importante et demeurent attachés fermement à la surface du minéral osseux. Dans ce cas, le tissu osseux peut être considéré comme réservoir de molécules de bisphosphonates et

capable de maintenir l'action des bisphosphonates pour de longues périodes. Cependant, la conservation à long terme des bisphosphonates peut avoir des inconvénients sur certaines populations tels les enfants et les femmes en âge de procréer, ou lorsque l'association à d'autres traitements est nécessaire (l'hormone parathyroïde humaine par exemple) (Black et al., 2003).

Les bisphosphonates inhibent aussi la dissolution des cristaux phosphocalciques (Fleisch, 1998). Cette observation était à la base des différents modèles proposés pour élucider l'effet inhibiteur de la résorption osseuse induit par ces composés (Russell et al., 1970). Cependant, et avec le développement et l'étude d'autres bisphosphonates plus puissants, il apparaît assez clair que l'effet physico-chimique ne peut à lui seul expliquer le mode d'action des BPs sur la résorption osseuse et que des mécanismes biologiques sont fortement impliqués.

Bien que les effets des bisphosphonates sur la calcification soient principalement dûs à des mécanismes physico-chimiques, ce n'est pas le cas pour la résorption osseuse. En effet, l'inhibition de la résorption osseuse peut s'expliquer en grande partie, sinon pas entièrement, par des mécanismes cellulaires. Ceux-ci peuvent être considérés à trois niveaux fortement liés les uns aux autres: tissulaire, cellulaire et moléculaire.

Les concentrations de bisphosphonates nécessaires pour inhiber la résorption osseuse *in vivo* sont si faibles qu'elles sont peu efficaces pour avoir un impact significatif sur la dissolution des minéraux (Fleisch, 1998). De plus, les études réalisées sur une large gamme de BPs n'ont montré aucune corrélation entre l'inhibition de la dissolution des minéraux *in vitro* et l'activité pharmacologique sur la résorption osseuse *in vitro* (Van Beek et al., 2003) ou *in vivo* (Shinoda et al., 1983). Il a été donc admis par la plupart des chercheurs que le mode d'action des BPs sur la résorption osseuse est essentiellement de nature cellulaire.

La principale cellule cible des bisphosphonates est l'ostéoclaste mature, même si certains effets sur leurs précurseurs (Russell et al., 2008) ou sur les ostéoblastes (Yoshida et al., 2005) ont été décrits. Après leur administration, les bisphosphonates sont adsorbés à la surface du minéral osseux par liaison au calcium de la phase minérale osseuse. Lors du phénomène de résorption, les bisphosphonates sont libérés de la phase minérale osseuse sous l'effet de l'acidité produite dans la chambre de résorption par les ostéoclastes. Les bisphosphonates pénètrent alors par endocytose dans l'ostéoclaste (Russell, 2007c) où ils vont agir sur différentes voies métaboliques pour aboutir à l'inhibition, voire à l'apoptose de la cellule (Russell et al., 2007a). C'est à ce niveau que se différencient les deux catégories de bisphosphonates. Les non-amino-bisphosphonates, comme le tiludronate, l'etidronate et le clodronate, sont

métabolisés dans l'ostéoclaste et aboutissent à la formation de métabolites toxiques de l'adénosine triphosphate (ATP) (Van Beek et al., 2003), non hydrolysables, qui s'accumulent dans la cellule, l'inhibent puis la tuent (Russell, 2007b).

Par contre, les bisphosphonates contenant de l'azote dans leur chaîne latérale (aminobisphosphonates; exemples : le pamidronate, l'alendronate, l'ibandronate, le risédronate et le zolédronate) ne sont pas métabolisés (incorporés) dans l'ostéoclaste mais agissent principalement en inhibant une enzyme de la biosynthèse du mévalonate, la farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) (Van Beek et al., 2003). Cette inhibition enzymatique empêche la prénylation et inhibe la fonction de petites protéines régulatrices responsables de l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP) (GTPases Ras, Rab, Rho et Rac) indispensables au processus de signalisation intracellulaire. Ceci perturbe la fonction cellulaire et désorganise notamment le cytosquelette, fait disparaître la bordure en brosse, et aboutit à l'inactivation puis à l'apoptose de l'ostéoclaste (Russell, 2007b). Au sein de cette classe, le pamidronate semble néanmoins se démarquer par un mécanisme d'action visant aussi une autre cible que la voie du mévalonate, encore indéterminée (Van Beek et al., 2003), tandis que le zolédronate, outre son action inhibitrice sur la voie du mévalonate, bloquerait aussi une translocase mitochondriale (Russell et Rogers, 1999). La distance entre l'atome d'azote et le groupe P-C-P ainsi que la configuration spatiale de la chaîne latérale R2 semble constituer les principaux déterminants de la puissance d'un aminobisphosphonate (Fleisch, 1998). Les plus puissants connus actuellement sont ceux contenant un atome d'azote dans un anneau hétérocyclique comme le risédronate et le zolédronate (Russell et al, 2007a).

VI- CONCLUSION

La réactivité des apatites nanocristallines vis-à-vis du risédronate monosodique en milieu aqueux a été étudiée. L'adsorption des molécules de risédronate est un processus rapide. Cela est vraisemblablement dû à la grande affinité de ces molécules pour la surface des nanocristaux étudiés. Dans tous les cas examinés, l'allure des isothermes d'adsorption du risédronate est de type Langmuir. Les paramètres caractéristiques de l'adsorption dépendent étroitement des propriétés du solide. Le processus d'adsorption du risédronate semble être gouverné par un phénomène d'échange ionique impliquant les ions phosphate de la surface des apatites nanocristallines étudiées. Les tests de réversibilité vis-à-vis de lavages successifs des poudres de ANC montre que l'adsorption des molécules de risédronates est un phénomène non réversible.

La capacité de rétention des solides ANC diminue avec la durée de maturation. Cette évolution est associée à l'appauvrissement de la couche hydratée en ions labiles après maturation. Ces environnements instables à la surface des nanocristaux d'apatite constituent des sites privilégiés pour l'adsorption des molécules d'adsorbat. La fixation des molécules de risédronate inhibe la restructuration de la couche hydratée gênant ainsi l'évolution de ces solides nanocristallins vers un état de cristallinité meilleure.

L'étude comparée des propriétés d'adsorption des phosphates de calcium vis-à-vis du risédronate montre que la réactivité des apatites nanocristallines similaires au tissu osseux est plus importante que celle de l'hydroxyapatite, support de référence. Il apparaît que la présence des groupements labiles à la surface des nanocristaux constitue des sites privilégiés pour les molécules de risédronate.

La caractérisation des solides obtenus après adsorption permet de préciser la nature des molécules de risédronate fixées par l'apatite. La forte interaction entre groupements phosphonate et sites calcium de la surface a été bien établie. Cette étude semble exclure dans les conditions expérimentales adoptées la formation d'une phase séparée à la surface des matériaux examinés.

CONCLUSION GENERALE

L'étude des phénomènes physico-chimiques intervenant à l'interface entre phosphates de calcium d'intérêt biologique et molécules de bisphosphonate nous a amené dans une première étape à élaborer et caractériser deux catégories de supports : (i) l'hydroxyapatite, un support bien cristallisé et utilisé en chromatographie en phase liquide et dans la composition de matériau orthopédique et (ii) des apatites nanocristallines analogues à la phase minérale des tissus calcifiés.

Les conditions de synthèse affectent considérablement les caractéristiques physico-chimiques des solides préparés et influent par conséquent sur leurs propriétés d'adsorption. Les cristaux obtenus à pH basique et à température proche de 90°C sont caractéristiques d'hydroxyapatite bien cristallisée, légèrement sous stoechiométrique (Ca/P = 1,64) et présentant une surface spécifique voisine de 59 m²/g. Les solides préparés à pH physiologique (7,4) et à température ambiante (20 ± 2°C) sont des apatites nanocristallines carbonatées (ANC) analogues au minéral osseux. Ces apatites se caractérisent par des surfaces spécifiques élevées (96 – 201 m²/g), d'une importance prépondérante dans la réactivité du matériau. Les phosphates octocalciques apatitiques (OCPa et OCPa-c) formés en milieu eau éthanol s'apparentent à une phase apatitique mal cristallisée et présentent des surfaces spécifiques relativement faibles (49 – 90 m²/g), comparées aux apatites nanocristallines ANC.

Les supports nanocristallins sont dotés à leur surface d'une couche hydratée, riche en environnements non-apatitiques labiles (en particulier des ions phosphate et carbonate). La maturation (vieillessement) des cristaux dans leurs solutions mères se traduit par une diminution des teneurs en espèces labiles. Cette évolution affecte également les propriétés microstructurales des nanocristaux : augmentation de la taille apparente des cristallites, amélioration de la cristallinité et évolution vers des solides moins lacunaires.

Afin de spécifier la nature de l'interaction lors de l'adsorption du bisphosphonate par les supports apatitiques examinés, nous avons procédé dans une seconde étape à l'élaboration des sels du risédronate de calcium susceptibles de se former en présence d'ions calcium en solution. Pour cela nous avons fait appel à différentes techniques spectroscopiques complémentaires. Ainsi, deux familles distinctes de précipités ont été identifiés selon le rapport molaire en solution (Ca/BP) et le pH du milieu: il s'agit de sels de risédronate de calcium amorphe (noté Ca₂BP) et de composés cristallins (noté CaBP). Par ailleurs, l'étude menée par conductimétrie confirme la nature des fortes interactions mises en jeu entre les espèces bisphosphoniques et les ions calcium en solution.

La réactivité des apatites préparées vis-à-vis des molécules de risédronate dépend des propriétés physico-chimiques du matériau et des caractéristiques de la

solution. Bien que les apatites préparées soient de nature différente (HA, ANC, OCPa et OCPa-c), les isothermes d'adsorption obtenues ont une allure de type Langmuir. Toutefois, les facteurs qui gouvernent les phénomènes qui interviennent à l'interface entre risédronate et apatites phosphocalciques sont divers.

L'étude menée avec les apatites nanocristallines atteste de l'implication des environnements non apatitiques dans le processus de fixation des molécules de risédronate à la surface des matériaux. En effet, les cristaux fraîchement précipités est dont les surfaces sont riches en ions phosphate et carbonate non apatitiques, fixent la plus grande quantité de molécules de risédronate par unité de surface, comparés au solides maturés. Ces espèces labiles et facilement échangeables constituent ainsi des sites privilégiés pour les molécules d'adsorbat. De ce fait une corrélation a été établie entre les quantités de risédronate adsorbé, d'une part, et la teneur en environnements non-apatitiques localisés dans la couche hydratée à la surface des nanocristaux apatitiques, d'autre part. Il est à noter par ailleurs que l'évolution des propriétés microstructurales et la stoechiométrie lors du vieillissement pourrait être en partie responsable de la diminution de la capacité de rétention des cristaux maturés.

L'analyse globale des résultats obtenus indique que la modification des conditions expérimentales (pH, teneur en ions minéraux actifs, température...) influe sur le nombre de sites spécifiques à l'adsorption des molécules de risédronate. Inversement, l'adsorption du risédronate à la surface des cristaux apatitiques affecte considérablement la composition de la solution. L'analyse détaillée des surnageants recueillis après incubation met en évidence la mise en solution d'ions minéraux (dissolution du minéral): la teneur en ions phosphate libérée est proportionnelle à la quantité en bisphosphonate fixée à la surface du support. Par ailleurs, la présence (ajout) d'ions phosphate dans le milieu d'incubation inhibe la rétention des molécules suite à leur compétition pour les sites actifs à la surface du minéral. Ces observations traduisent l'existence d'un équilibre d'échange ionique entre les molécules d'adsorbats de la solution et les ions phosphate de la surface du minéral apatitique. En outre, le lien établi entre la composition de la couche hydratée à la surface des apatites nanocristallines et leur capacité d'adsorption, d'une part, et l'irréversibilité du processus vis-à-vis de la dilution ainsi que le déplacement des espèces initialement fixées en présence d'ions phosphate, d'autre part, attestent de l'existence d'une réaction d'échange ionique.

Cependant, l'évolution complexe des teneurs en ions calcium mis en solution selon la gamme de concentration en adsorbat explorée (évolution non monotone et libération ascendante, respectivement pour gammes de concentrations faible et élevée)

suggère que les phénomènes physico-chimiques qui interviennent à la surface du matériau ne se limitent pas à un simple processus d'échange tel décrit précédemment.

Les observations expérimentales issues de la combinaison des différentes méthodes d'analyses spectroscopiques (FTIR, Raman, et RMN de l'état solide) mettent en évidence des modifications et déplacements significatifs des bandes et pics caractéristiques des espèces adsorbées; ces modifications chimiques sont indicatives non seulement d'interactions fortes survenant à l'interface apatite-riséronate, mais attestent aussi d'un changement de l'environnement local des noyaux de phosphore des groupements phosphonate.

L'ensemble des résultats obtenus dans les diverses conditions examinées indique que la surface du minéral est éventuellement le siège de divers phénomènes dépendant les uns des autres: échange ionique, dissolution, complexation et/ou précipitation de sel de risédronate de calcium. Ces processus complexes semblent altérer et/ou ralentir la restructuration de la couche hydratée (blocage de sites actifs) et inhibent son évolution vers des formes plus stables.

Ce travail constitue une base de données pour la compréhension des phénomènes gouvernant la réactivité des phosphates de calcium apatitiques vis-à-vis du milieu environnant et complète l'ensemble de travaux engagés dans la littérature. Les connaissances ainsi acquises dans le domaine seront éventuellement mises à profit pour la mise au point de biomatériaux (en particulier des ciments) pour délivrer de façon locale, lente et progressive le principe actif de choix (médicaments). Cette recherche engloberait la partie *in vitro* et *in vivo* sur les biomatériaux et impliquerait une collaboration pluridisciplinaire fédérant des chimistes, chirurgiens orthopédistes, pharmaciens, biologistes, ...

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aissa A., Debbabi M., Gruselle M., Thouvenot R., Gredin P., Traksmaa R., Tõnsuaadu K., "Covalent modification of calcium hydroxyapatite surface by grafting phenyl phosphonate moieties", *J. Solid State Chem.*, **180**(8), 2273-2278 (2007).
- Al-Kattan A., Errassifi F., Sautereau A.M., Sarda S., Dufour P., Barroug A., Dos Santos I., Combes C., Grossin D., Rey C., Drouet C., "Medical potentialities of biomimetic apatites through adsorption, ionic substitution, and mineral/organic associations: three illustrative examples", *Adv. Eng. Mater.*, **12**(7), B224-B233 (2010).
- Alves F.C., Donato P., Sherry A.D., Zaheer A., Zhang S., Lubag A.J.M., Merritt M.E., Lenkinski R.E., Frangioni J.V., Neves M., "Silencing of phosphonate-gadolinium magnetic resonance imaging contrast by hydroxyapatite binding", *Inves. Radio.*, **38**(12), 750-760 (2003).
- Amankonah J.O., Somasundaran P., "Effects of dissolved mineral species on the electrokinetic behavior of calcite and apatite", *Colloids Surf.*, **15**, 335-353 (1985).
- Amjad Z., "Calcium phosphates in biological and industrial systems", Kluwer Academic Publishers, USA (1997).
- Anderson H.C., "Molecular biology of matrix vesicles", *Clin. Orthop. Relat. Res.*, (314), 266-280 (1995).
- Aoba T., Moreno E.C., "Adsorption of phosphoserine onto hydroxyapatite and its inhibitory activity on crystal growth", *J. Colloid Interface Sci.*, **106**(1), 110-121 (1985).
- Aoki H., "Medical applications of hydroxyapatite", Ishiyaku EuroAmerica, Inc., Tokyo (1994).
- Aptel J.D., Thomann J.M., Voegel J.C., Schmitt A., Bres E.F., "Adsorption of human albumin onto hydroxyapatite. Static and dynamic studies", *Colloids Surf.*, **32**, 159-171 (1988).
- Areas E.P.G., Galembeck F., "Adsorption of carboxymethylcellulose onto hydroxyapatite", *J. Colloid Interface Sci.*, **147**(2), 370-377 (1991).
- Azoulay C., "Ménopause en 2004: le «traitement hormonal substitutif» n'est plus ce qu'il était", *La revue de médecine interne*, **25**(11), 806-815 (2004).
- Barroug A., "Etude comparée des propriétés d'adsorption de quelques orthophosphates de calcium d'intérêt biologique", Thèse de 3^{ème} Cycle, INP, Toulouse (1982).
- Barroug A., Rey C., Fauran M.J., Trombe J.C., Montel G., Bonel G., "Sur les processus de dissolution et de recristallisation des phosphates dans les milieux biologiques: rôle de phénomènes d'adsorption", *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **4**, 535-539 (1985).
- Barroug A., "Propriétés de surface des apatites et adsorption de protéines", Thèse d'Etat, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve (1989).

- Barroug A., Lemaitre J., Rouxhet P.G., "Lysozyme on apatites: A model of protein adsorption controlled by electrostatic interactions", *Colloids Surf.*, **37**, 339-355 (1989).
- Barroug A., Lemaitre J., Rouxhet P.G., "Influence of crystallite size on the surface properties of calcium-deficient hydroxyapatites", *J. Alloys Comp.*, **188**, 152-156 (1992).
- Barroug A., Fastrez J., Lemaitre J., Rouxhet P.G., "Adsorption of succinylated lysozyme on hydroxyapatite", *J. Colloid Interface Sci.*, **189**(1), 37-42 (1997).
- Barroug A., Lernoux E., Lemaitre J., Rouxhet P.G., "Adsorption of catalase on hydroxyapatite", *J. Colloid Interface Sci.*, **208**(1), 147-152 (1998).
- Barroug A., Glimcher M.J., "Hydroxyapatite crystals as a local delivery system for cisplatin: adsorption and release of cisplatin in vitro", *J. Orthop. Res.*, **20**(2), 274-280 (2002).
- Barroug A., Kuhn L.T., Gerstenfeld L.C., Glimcher M.J., "Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: in vitro controlled adsorption and release", *J Orthop. Res.*, **22**(4), 703-708 (2004).
- Barroug A., Legrouri A., Rey C., "Exchange reactions at calcium phosphates surface and applications to biomaterials", *Key Eng. Mater.*, **361**, 79-82 (2008).
- Basset C.A.L., Donath A., Macagno F., Preis R., Fleish H., Francis M.D., "Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans progressiva", *Lancet*, **11**, 845-849 (1969).
- Beissinger R.L., Leonard E.F., "Plasma protein adsorption and desorption rates on quartz: approach to multi-component systems", *ASAIO J.*, **27**, 225-230 (1981).
- Benaziz L., Barroug A., Legrouri A., Rey C., Lebugle A., "Adsorption of O-phospho-L-serine and L-serine onto poorly crystalline apatite", *J. Colloid Interface Sci.*, **238**(1), 48-53 (2001).
- Benaziz L., "Réactivité de phosphates de calcium vis-à-vis d'acides aminés et conséquences biologiques", Thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Marrakech (2002).
- Bennani M., Lebugle A., Bonel G., "Contribution a l'étude des apatites carbonatées déficientes en ions calcium. II: Décomposition thermique des coprécipités de phosphate de calcium-carbonate de calcium de structure apatitique", *Ann. Chim. Fr.*, **18**(4), 245-256 (1993).
- Bennani M., "Système phosphate de calcium-carbonate de calcium en milieu eau-éthanol: Synthèse, caractérisation et réactivité", Thèse d'Etat, Université Ibn Tofail, Kénitra (1998).
- Beshah K., Rey C., Glimcher M., Schimizu M., Griffin R., "Solid state carbon-13 and proton NMR studies of carbonate-containing calcium phosphates and enamel", *Journal of Solid State Chemistry*. **84**(1), 71-81 (1990).

- Betts F., Posner A.S., "An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate", *Mater. Res. Bul.*, **9**(3), 353-360 (1974).
- Bihi N., Bennani M., Taitai A., Lebugle A., "Adsorption d'acides aminés sur des phosphates de calcium carbonatés analogues aux tissus calcifiés", *Ann. Chim. Sci. Mat.*, **27**(2), 61-70 (2002).
- Billon-Chabaud A., Merle C., Bouler J., "Influence of Association Type of Bisphosphonates with Calcium-Deficient Apatite on Drug Release", *Key Eng. Mater.*, **361**, 51-54 (2008).
- Billon-Chabaud A., Gouyette A., Merle C., Bouler J., "Development of bisphosphonates controlled delivery systems for bone implantation: influence of the formulation and process used on in vitro release", *J. Mater. Sci: Mater in Medic.*, **21**(5), 1599-1604 (2010).
- Black D., Greenspan S., Ensrud K., Palermo L., McGowan J., Lang T., Garnero P., Bouxsein M., Bilezikian J., Rosen C., "The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis", *New England J. Medic.*, **349**(13), 1207 (2003).
- Blomen L.J.M.J., "History of bisphosphonates: discovery and history of the non-medical uses of bisphosphonates", in " Bisphosphonate on bones" Ed. Bijouet O.L.M., Fleisch H., Canfield R.E., Russell R.G.G., Elsevier, Amsterdam, (1995).
- Blumenthal N.C., Posner A.S., "Hydroxyapatite: mechanism of formation and properties", *Calcif. Tissue Inter.*, **13**(1), 235-243 (1973).
- Blumenthal N.C., Betts F., Posner A.S., "Formation and structure of Ca-deficient hydroxyapatite", *Calcif. Tissue Inter.*, **33**(1), 111-117 (1981).
- Boanini E., Gazzano M., Rubini K., Bigi A., "Composite nanocrystals provide new insight on alendronate interaction with hydroxyapatite structure", *Adv. Mater.*, **19**(18), 2499-2502 (2007).
- Bonel G., "Contribution à l'étude de la carbonatation des apatites", Thèse d'Etat, UPS, Toulouse (1972).
- Boskey A., Maresca M., Appel J., "The effects of noncollagenous matrix proteins on hydroxyapatite formation and proliferation in a collagen gel system", *Connect Tissue Res.*, **21**(1-4), 171-178 (1989a).
- Boskey A.L., "Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization", *Bone Miner.*, **6**(2), 111-123 (1989b).
- Boskey A.L., Maresca M., Doty S., Sabsay B., Veis A., "Concentration-dependent effects of dentin phosphophoryn in the regulation of in vitro hydroxyapatite formation and growth", *Bone Miner.* **11**(1), 55-65 (1990).

- Boskey A.L., "Mineral-matrix interactions in bone and cartilage", *Clin. Orthop. Relat. Res.*, (281), 244-274 (1992).
- Boskey A.L., Maresca M., Ullrich W., Doty S.B., Butler W.T., Prince C.W., "Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel", *Bone Miner.*, **22**(2), 147-159 (1993).
- Boskey A.L., "Matrix proteins and mineralization: an overview", *Connect Tissue Res.*, **35**(1-4), 357-363 (1996).
- Boskey A.L., "Biom mineralization: conflicts, challenges, and opportunities", *J. Cell. Biochem. Suppl.*, **30-31**, 83-91 (1998).
- Breuil V., Euller-Ziegler L., "Nutrition et vieillissement osseux: L'ostéoporose", *Nutri. Clin. Métab.*, **18**(4), 212-218 (2004).
- Brown C.E., Battocletti J.H., Srinivasan R., Allaway J.R., Moore J., Sigmann P., "In vivo ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy of bone mineral for evaluation of osteoporosis", *Clin. Chem.*, **34**(7), 1431-1438 (1988).
- Browning F.H., Fogler H.S., "Effect of synthesis parameters on the properties of calcium phosphonate precipitates", *Langmuir*, **11**(10), 4143-4152 (1995).
- Browning F.H., Fogler H.S., "Effect of Precipitating Conditions on the Formation of Calcium- HEDP Precipitates", *Langmuir*, **12**(21), 5231-5238 (1996).
- Budin J.P., Michel J.C., Auzel F., "Oscillator strengths and laser effect in Na₂Nd₂Pb₆(PO₄)₆Cl₂(chloroapatite), a new high-Nd-concentration laser material", *J. Appl. Phys.*, **50**(2), 641 (1979).
- Cazalbou S., "Echanges cationiques impliquant des apatites nanocristallines analogues au minéral osseux", Thèse de Doctorat, INP, Toulouse (2000).
- Cazalbou S., Combes C., Eichert D., Rey C., "Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates", *J. Mater. Chem.*, **14**(14), 2148-2153 (2004a).
- Cazalbou S., Combes C., Eichert D., Rey C., Glimcher M.J., "Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo", *J. Bone Miner. Metab.*, **22**(4), 310-317 (2004b).
- Charlot G., "Les méthodes de la chimie analytique, Analyse quantitative minérale", 5^{ème} édition, Ed. Masson, Paris (1966).
- Chen W.Y., Lin M.S., Lin P.H., Tasi P.S., Chang Y., Yamamoto S., "Studies of the interaction mechanism between single strand and double-strand DNA with hydroxyapatite by microcalorimetry and isotherm measurements", *Colloids Surf. A: Phys. Chem. Eng. Asp.*, **295**(1-3), 274-283 (2007).

- Cherif A., "Sulfuration et réactivité des catalyseurs à base de phosphate-calcium-nickel", Thèse de 3^{ème} Cycle, Université Hassan II Ain Chock, Casablanca (1993).
- Cho P.W., Fox J.L., Higuchi W.I., Pithayanukul P., "Influence of dodecylamine hydrochloride adsorption on the dissolution kinetics of hydroxyapatite", in " Adsorption on and surface chemistry of hydroxyapatite", Ed. Misra D., Springer, New York & London, (1984).
- Claessens R.A.M.J., Kolar Z.I., "Affinity of Tin(II) and Tin(II) diphosphonates for hydroxyapatite: an experimental and model study", *Langmuir*, **16**(3), 1360-1367 (2000).
- Combes C., Rey C., "Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity", *Biomaterials*, **23**(13), 2817-2823 (2002).
- Crane N.J., Popescu V., Morris M.D., Steenhuis P., Ignelzi M.A., Jr., "Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization", *Bone*, **39**(3), 434-442 (2006).
- Cuisinier F.J.G., "Bone mineralization", *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, **1**(3), 436-439 (1996).
- Cukrowski I., Popovic L., Barnard W., Paul S.O., van Rooyen P.H., Liles D.C., "Modeling and spectroscopic studies of bisphosphonate-bone interactions. The Raman, NMR and crystallographic investigations of Ca-HEDP complexes", *Bone*, **41**(4), 668-678 (2007).
- D'Andrea S.C., Fadeev A.Y., "Covalent surface modification of calcium hydroxyapatite using n-Alkyl- and n-Fluoroalkylphosphonic acids", *Langmuir*, **19**(19), 7904-7910 (2003).
- Dabbarh F., Lebugle A., Taitai A., Bennani M., "Influence du séchage sur la composition de phosphates de calcium carbonatés, analogues osseux", *Ann. Chim. Sci. Mat.*, **25**(5), 339-348 (2000).
- Delmas P.D., McClung M.R., Zanchetta J.R., Racewicz A., Roux C., Benhamou C.L., Man Z., Eusebio R.A., Beary J.F., Burgio D.E., "Efficacy and safety of risedronate 150 mg once a month in the treatment of postmenopausal osteoporosis", *Bone*, **42**(1), 36-42 (2008).
- Dorozhkin S.V., "A review on the dissolution models of calcium apatites", *Prog. Cryst. Grow. Charac. Mater.*, **44**(1), 45-61 (2002).
- Dorozhkin S.V., Epple M., "Biological and medical significance of calcium phosphates", *Angew. Chem. Inter. Ed.*, **41**(17), 3130-3146 (2002).
- Ea H.k., "Avancées pathogéniques des mécanismes de calcification du cartilage", *Rev. Rhum.*, **74**(2), 168-172 (2007).
- Eanes E.D., "Dynamics of calcium phosphate precipitation", *Calcif. Biol. Syst.*, **1**, 73-79 (1992).

- Eichert D., Sfihi H., Banu M., Cazalbou S., Combes C., Rey C., "Surface structure of nanocrystalline apatites for bioceramics and coatings", proceeding CIMTEC, (2002).
- Eichert D., Sfihi H., Combes C., Rey C., "Specific characteristics of wet nanocrystalline apatites. Consequences on biomaterials and bone tissue", Key. Eng. Mater., **254**, 927-930 (2004).
- Eichert D., Drouet C., Sfihi H., Rey C., Combes C., "Nanocrystalline apatite based biomaterials: synthesis, processing and characterisation", in " Biomaterials research advances" Ed. Kendall J.B., Nova Science. New York, (2008).
- El Hammari L., Laghizil A., Saoiabi A., Barboux P., Meyer M., "Chemical modification of porous calcium hydroxyapatite surfaces by grafting phenylphosphonic and phenylphosphite acids", Colloids Surf. A, **289**(1-3), 84-88 (2006).
- Elliott J.C., Holcomb D.W., Young R.A., "Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel", Calcif. Tissue Inter., **37**(4), 372-375 (1985).
- Elliott J.C., "Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates", Elsevier, Amsterdam (1994).
- Embery G., Rees S., Hall R., Rose K., Waddington R., Shellis P., "Calcium-and hydroxyapatite-binding properties of glucuronic acid-rich and iduronic acid-rich glycosaminoglycans and proteoglycans", Eur. J. Oral. Sci., **106**, 267-273 (1998).
- Flade K., Lau C., Mertig M., Pompe W., "Osteocalcin-Controlled Dissolution–Reprecipitation of Calcium Phosphate under Biomimetic Conditions", Chem. Mater., **13**(10), 3596-3602 (2001).
- Fleisch H., Russell R.G.G., Bisaz S., Casey P.A., Mühlbauer R.C., "The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium phosphate in vitro and in vivo", Calcif. Tissue Res., **2**, 10-10A (1968).
- Fleisch H., Russell R.G.G., Bisaz S., Mühlbauer R.C., Williams D.A., "The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo", Eur J. Clinical Invest., **1**(1), 12-18 (1970).
- Fleisch H., "Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use", Handb. Exper. pharm., **107**, 377-417 (1993).
- Fleisch H., "Bisphosphonates: mechanisms of action", Adv. Organ. Biol., **5**, 835-850 (1998).
- Fleisch H., "Bisphosphonates in osteoporosis", Eur. Spine J., **12** Suppl 2, S142-146 (2003).

- Fournier A., Clavel-Chapelon F., Hill C., "Traitement hormonal de la ménopause et risque de cancer du sein: commentaires sur les résultats de la million women study", *Bull. Cancer*, **90**, 924-926 (2003).
- Fujisawa R., Kuboki Y., "Preferential adsorption of dentin and bone acidic proteins on the (100) face of hydroxyapatite crystals", *Biochim. Biophys. Acta.*, **1075**(1), 56-60 (1991).
- Ginebra M.P., Traykova T., Planell J., "Calcium phosphate cements: Competitive drug carriers for the musculoskeletal system?", *Biomaterials*, **27**(10), 2171-2177 (2006).
- Glimcher M.J., Muir H., "Recent studies of the mineral phase in bone and its possible Linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds", *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B.*, **304**(1121), 479-508 (1984).
- Glimcher M.J., "The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification", *Instr. Course Lect.*, **36**, 49-69 (1987).
- Glimcher M.J., "Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo", *Anat. Rec.*, **224**(2), 139-153 (1989).
- Glimcher M.J., "The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification", in "Disorders of bone and mineral metabolism" Ed. Fredric L.C., Murray J.F., Raven Press Ltd., New York, **265-286** (1992).
- Gorbunoff M.J., "The interaction of proteins with hydroxyapatite: Role of protein charge and structure", *Anal. Biochem.*, **136**(2), 425-432 (1984).
- Govers J.A.P., Termont S.M.L., Van Aken G.A., "Characterization of the adsorption of conjugated and unconjugated bile acids to insoluble, amorphous calcium phosphate", *J. lipid Res.*, **35**, 741-748 (1994).
- Grossmann G., Grossmann A., Ohms G., Breuer E., Chen R., Golomb G., Cohen H., Hägele G., Classen R., "Solid-state NMR of bisphosphonates adsorbed on hydroxyapatite", *Magn. Reson. Chem.*, **38**(1), 11-16 (2000).
- Grynopas M.D., Bonar L.C., Glimcher M.J., "Failure to detect an amorphous calcium-phosphate solid phase in bone mineral: a radial distribution function study", *Calcif. Tissue Inter.*, **36**(1), 291-301 (1984).
- Grynopas M., Rey C., "The effect of fluoride treatment on bone mineral crystals in the rat", *Bone*, **13**(6), 423-429 (1992).
- Grynopas M.D., Omelon S., "Transient precursor strategy or very small biological apatite crystals?", *Bone*, **41**(2), 162 (2007).

- Guy J.M., Berthaud T., Gremillet E., Lamaud M., Verneyre H., "Scintigraphie au pyrophosphate de technétium 99m dans l'amylose cardiaque ", *La Presse médicale*, **17**(31) (1988).
- Habibovic P., Yuan H., van der Valk C.M., Meijer G., van Blitterswijk C.A., de Groot K., "3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials", *Biomaterials*, **26**(17), 3565-3575 (2005).
- Haque S., Rehman I., Darr J.A., "Synthesis and characterization of grafted nanohydroxyapatites using functionalized surface agents", *Langmuir*, **23**(12), 6671-6676 (2007).
- Harrison J.E., Hitchman A.J.W., Hasany S.A., Hitchman A., Tam C.S., "The effect of diet calcium on fluoride toxicity in growing rats", *Can. J. Physiol. & Pharm.*, **62**(3), 259-265 (1984).
- Hauschka P.V., Lian J.B., Cole D.E., Gundberg C.M., "Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone", *Physiol. Rev.*, **69**(3), 990-1047 (1989).
- Heughebaert J.C., "Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques", Thèse d'Etat, INP, Toulouse (1977).
- Heughebaert M., LeGeros R.Z., Gineste M., Guilhem A., Bonel G., "Physicochemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in nonosseous sites", *J. Biom. Mater. Res.*, **22**(S14), 257-268 (1988).
- Hina A., "Etude de la réactivité, en milieu aqueux, d'apatites phosphocalciques d'intérêt biologique", Thèse de Doctorat, INP, Toulouse (1996).
- Hirabayashi H., Sawamoto T., Fujisaki J., Tokunaga Y., Kimura S., Hata T., "Relationship between physicochemical and osteotropic properties of bisphosphonic derivatives: rational design for osteotropic drug delivery system (ODDS)", *Pharm. Res.*, **18**(5), 646-651 (2001).
- Hirabayashi H., Sawamoto T., Fujisaki J., Tokunaga Y., Kimura S., Hata T., "Dose-dependent pharmacokinetics and disposition of bisphosphonic prodrug of diclofenac based on osteotropic drug delivery system (ODDS)", *Biopharm. Drug Disp.*, **23**(8), 307-315 (2002).
- Hlady V., Füredi-Milhofer H., "Adsorption of human serum albumin on precipitated hydroxyapatite", *J. Colloid Interface Sci.*, **69**(3), 460-468 (1979).
- Hodge A.J., "Molecular models illustrating the possible distributions of 'holes' in simple systematically staggered arrays of type I collagen molecules in native-type fibrils", *Connect Tissue Res.*, **21**(1-4), 137-147 (1989).
- Hounslow A.M., Carran J., Brown R., Rejman D., Blackburn G.M., Watts D.J., "Determination of the microscopic equilibrium dissociation constants for risedronate and its

analogues reveals two distinct roles for the nitrogen atom in nitrogen-containing bisphosphonate drugs", *J. Med. Chem.*, **51**(14), 4170-4178 (2008).

- Hunter G.K., Hauschka P.V., Poole A.R., Rosenberg L.C., Goldberg H.A., "Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins", *Biochem J.*, **317** (Pt 1), 59-64 (1996a).

- Hunter G.K., "Interfacial aspects of biomineralization", *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, **1**(3), 430-435 (1996b).

- Itokazu M., Matsunaga T., Kumazawa S., Wenyi Y., "A novel drug delivery system for osteomyelitis using porous hydroxyapatite blocks loaded by centrifugation", *J. Appl. Biom.*, **6**(3), 167-169 (1995).

- Jäger C., Welzel T., Meyer Zaika W., Epple M., "A solid state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite", *Magn. Reso. Chem.*, **44**(6), 573-580 (2006).

- Jindong Z., Hai T., Junchao G., Wang B., Li B., Qiang W.B., "Evaluation of a Novel Osteoporotic Drug Delivery System In Vitro: Alendronate-loaded calcium phosphate cement", *Orthopedics*, **33**(8), 561-569 (2010).

- Johnsson M., Richardson C.F., Sallis J.D., Nancollas G.H., "Adsorption and mineralization effects of citrate and phosphocitrate on hydroxyapatite", *Calcif. Tissue Int.*, **49**(2), 134-137 (1991).

- Josse S., "Synthèse d'analogues de C-nucléosides pyrroliques et nouvelle méthode de thio-glycosylation directe. Stratégie innovante pour le traitement local de la résorption osseuse", Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences et Techniques, Nantes (2003).

- Josse S., Faucheux C., Soueidan A., Grimandi G., Massiot D., Alonso B., Janvier P., Laib S., Pilet P., Gauthier O., Daculsi G., Guicheux J.J., Bujoli B., Bouler J.M., "Novel biomaterials for bisphosphonate delivery", *Biomaterials*, **26**(14), 2073-2080 (2005).

- Juillard A., Falgayrac G., Cortet B., Vieillard M.-H., Azaroual N., Hornez J.-C., Penel G., "Molecular interactions between zoledronic acid and bone: An in vitro Raman microspectroscopic study", *Bone*, **47**(5), 895-904 (2010).

- Jung A., Bisaz S., Fleisch H., "The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals", *Calcif. Tissue Res.*, **11**(4), 269-280 (1973).

- Kambara M., Norde W., "Influence of fluoride applications on some physicochemical surface properties of synthetic hydroxyapatite and human dental enamel and its consequences for protein adsorption", *Car. Res.*, **29**(3), 210-217 (1995).

- Kan A.T., Oddo J.E., Tomson M.B., "Formation of two calcium diethylenetriaminepentakis (methylene phosphonic acid) precipitates and their physical chemical properties", *Langmuir*, **10**(5), 1450-1455 (1994).
- Kandori K., Sawai S., Yamamoto Y., Saito H., Ishikawa T., "Adsorption of albumin on calcium hydroxylapatite", *Colloids Surf.*, **68**(4), 283-289 (1992).
- Kandori K., Shimizu T., Yasukawa A., Ishikawa T., "Adsorption of bovine serum albumin onto synthetic calcium hydroxyapatite: influence of particle texture", *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **5**(1-2), 81-87 (1995a).
- Kandori K., Saito M., Takebe T., Yasukawa A., Ishikawa T., "Adsorption of bovine serum albumin on synthetic carbonate calcium hydroxyapatite", *J. Colloid Interface Sci.*, **174**(1), 124-129 (1995b).
- Kandori K., Saito M., Saito H., Yasukawa A., Ishikawa T., "Adsorption of protein on non-stoichiometric calcium--strontium hydroxyapatite", *Colloids Surf. A: Phys. Chem. Eng. Asp.*, **94**(2-3), 225-230 (1995c).
- Kandori K., Fudo A., Ishikawa T., "Study on the particle texture dependence of protein adsorption by using synthetic micrometer-sized calcium hydroxyapatite particles", *Colloids Surf. B: Biointerfaces.*, **24**(2), 145-153 (2002).
- Kawasaki T., Niikura M., Kobayashi Y., "Fundamental study of hydroxyapatite high-performance liquid chromatography III: Direct experimental confirmation of the existence of two types of adsorbing surface on the hydroxyapatite crystal", *J. Chromatogr. A*, **515**, 125-148 (1990).
- Kawasaki T., "Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing", *J. Chromatogr. A*, **544**, 147-184 (1991).
- Krisanapiboon A., Buranapanitkit B., Oungbho K., "Biocompatibility of hydroxyapatite composite as a local drug delivery system", *J. Orthop. Surg.*, **14**(3), 315-318 (2006).
- Kubíček V., Rudovský J., Kotek J., Hermann P., Vander Elst L., Muller R., Kolar Z., Wolterbeek H., Peters J., Lukeš I., "A bisphosphonate monoamide analogue of DOTA: a potential agent for bone targeting", *J. Am. Chem. Soc.*, **127**(47), 16477-16485 (2005).
- Kuhn L.T., Grynblas M.D., Rey C.C., Wu Y., Ackerman J.L., Glimcher M.J., "A comparison of the physical and chemical differences between cancellous and cortical bovine bone mineral at two ages", *Calcif. Tissue Int.*, **83**(2), 146-154 (2008).
- Labarthe J.C., Bonel G., Montel G., "Sur la structure et les propriétés des apatites carbonatées de type B phospho-calciques", *Ann. Chim.*, **8**(5), 289-301 (1973).

- Lawson M.A., Xia Z., Triffitt J.T., Ebetino F.H., Phipps R.J., Russell R.G.G., "Refining the use of hydroxyapatite column chromatography to reveal differences in relative binding affinities of bisphosphonates", *Bone*, **38**(3), 55-55 (2006).
- Lebugle A., Zahidi E., Bonel G., "Effect of structure and composition on the thermal decomposition of calcium phosphates (Ca/P= 1.33)", *React. Soli.*, **2**(1-2), 151-161 (1986).
- Lebugle A., Rodrigues A., Bonneville P., Voigt J.J., Canal P., Rodriguez F., "Study of implantable calcium phosphate systems for the slow release of methotrexate", *Biomaterials*, **23**(16), 3517-3522 (2002).
- LeGeros R.Z., Bonel G., Legros R., "Types of "H₂O" in human enamel and in precipitated apatites", *Calcif. Tissue Inter.*, **26**(1), 111-118 (1978).
- LeGeros R.Z., "Apatites in biological systems", *Prog. Cryst. Growth Charact.*, **4**, 1-45 (1981).
- LeGeros R.Z., "Calcium phosphates in oral biology and medicine", in " Monographs in oral Science" Ed. Myers H.M., Karger, London, **15** (1991).
- Legros R., "Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés", Thèse, INP, Toulouse (1984).
- Legros R., Balmain N., Bonel G., "Structure and composition of the mineral phase of periosteal bone", *J.Chem. Res. Syn.*, **1**, 8-9 (1986).
- Leu C.-T., Luegmayr E., Freedman L.P., Rodan G.A., Reszka A.A., "Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy", *Bone*, **38**(5), 628-636 (2006).
- Leung J.Y.Y., Ho A.Y.Y., Ip T.P., Lee G., Kung A.W.C., "The efficacy and tolerability of risedronate on bone mineral density and bone turnover markers in osteoporotic chinese women: a randomized placebo-controlled study", *Bone*, **36**(2), 358-364 (2005).
- Lin J.H., "Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties", *Bone* **18**(2), 75-85 (1996).
- Linde A., Lussi A., Crenshaw M.A., "Mineral induction by immobilized polyanionic proteins", *Calcif. Tissue Int.*, **44**(4), 286-295 (1989).
- López-Macipe A., Gómez-Morales J., Rodríguez-Clemente R., "The Role of pH in the Adsorption of Citrate Ions on Hydroxyapatite", *J. Colloid Interface Sci.*, **200**(1), 114-120 (1998).
- Luo E., Liu X., Wei S.C., Cai X.X., Hu J., "Osteoblast adhesion to clodronate-hydroxyapatite composite", *Appl. Surf. Sci.*, **255**(2), 308-311 (2008).

- Lyengar G.V., Tandon L., "Minor and trace elements in human bones and teeth", NAHRES-39 report, Inter. Atomic Energy Agency, Vienna (1999).
- Mandel I.D., Concool B., "Salivary protein interactions with cations and anions", *J. Dent. Res.*, **54** (Special Issue A), Abstract L 94 (1975).
- Matczak-Jon E., Videnova-Adrabska V., "Supramolecular chemistry and complexation abilities of diphosphonic acids", *Coord. Chem. Rev.*, **249**(21-22), 2458-2488 (2005).
- Matczak-Jon E., Kurzak B., Kafarski P., Wozna A., "Coordination abilities of piperid-1-yl-methane-1, 1-diphosphonic acids towards zinc (II), magnesium (II) and calcium (II): potentiometric and NMR studies", *J. Inorg. Biochem.*, **100**(7), 1155-1166 (2006).
- Matsumoto T., Okazaki M., Inoue M., Yamaguchi S., Kusunose T., Toyonaga T., Hamada Y., Takahashi J., "Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein", *Biomaterials*, **25**(17), 3807-3812 (2004).
- Merry J., "Preparation and characterisation of carbonate hydroxyapatite", Queen Mary and Westfield college, London (2000).
- Meunier P.J., Delmas P.D., Eastell R., McClung M.R., Papapoulos S., Rizzoli R., Seeman E., Wasnich R.D., "Diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women: clinical guidelines", *Clini. Therap.*, **21**(6), 1025-1044 (1999).
- Meyer J.L., Nancollas G.H., "The influence of multidentate organic phosphonates on the crystal growth of hydroxyapatite", *Calcif. Tissue Res.* **13**(4), 295-303 (1973).
- Midy V., Rey C., Bres E., Dard M., "Basic fibroblast growth factor adsorption and release properties of calcium phosphate", *J. Biomed. Mater. Res.*, **41**(3), 405-411 (1998).
- Midy V., Dard M., Hollande E., "Evaluation of the effect of three calcium phosphate powders on osteoblast cells", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **12**(3), 259-265 (2001).
- Mihai B., "Mise en forme d'apatites nanocristallines : Ceramiques et Ciments", Thèse de Doctorat, INP, Toulouse (2005).
- Mishra R.K., Chander S., Fuerstenau D.W., "Effect of ionic surfactants on the electrophoretic mobility of hydroxyapatite", *Colloids Surf.*, **1**(1), 105-119 (1980).
- Misra D.N., "Adsorption of low molecular weight poly (acrylic acid) on hydroxyapatite: role of molecular association and apatite dissolution", *Langmuir*, **7**(11), 2422-2424 (1991a).
- Misra D.N., "Adsorption and orientation of tetracycline on hydroxyapatite", *Calcif. Tissue Int.*, **48**(5), 362-367 (1991b).
- Misra D.N., "Interaction of citric acid with hydroxyapatite: surface exchange of ions and precipitation of calcium citrate", *J. Dent. Res.* **75**(6), 1418-1425 (1996).

- Misra D.N., "Interaction of ortho-Phospho-l-serine with Hydroxyapatite: Formation of a Surface Complex", *J Colloid Interface Sci.*, **194**(1), 249-255 (1997).
- Moreno E.C., Kresak M., Hay D.I., "Adsorption of two human parotid salivary macromolecules on hydroxy-, fluorhydroxy-and fluorapatites", *Archs. Oral. Biol.*, **23**(7), 525-533 (1978).
- Moreno E.C., Kresak M., Hay D.I., "Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich human salivary proteins onto calcium apatites", *J. Biol. Chem.*, **257**(6), 2981-2989 (1982).
- Moreno E.C., Kresak M., Hay D.I., "Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite", *Calcif. Tissue Int.*, **36**(1), 48-59 (1984).
- Mukherjee S., Song Y., Oldfield E., "NMR investigations of the static and dynamic structures of bisphosphonates on human bone: A molecular model", *J. Am. Chem. Soc.*, **130**(4), 1264-1273 (2008).
- Mukherjee S., Huang C., Guerra F., Wang K., Oldfield E., "Thermodynamics of bisphosphonates binding to human bone: a two-site model", *J. Am. Chem. Soc.*, **131**(24), 8374-8375 (2009).
- Nancollas G.H., Tang R., Phipps R.J., Henneman Z., Gulde S., Wu W., Mangood A., Russell R.G., Ebetino F.H., "Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite", *Bone*, **38**(5), 617-627 (2006).
- Neuman W.F., Neuman M.W., "The chemical dynamics of bone mineral", University of Chicago Press, Chicago (1958).
- Norde W., MacRitchie F., Nowicka G., Lyklema J., "Protein adsorption at solid-liquid interfaces: Reversibility and conformation aspects", *J Colloid Interface Sci.*, **112**(2), 447-456 (1986).
- Norde W., Haynes C.A., "Reversibility and the mechanism of protein adsorption", in "Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications" Ed. Horbett T.A. and Brash J.L., ACS Publications, California, **602**, 27-40 (1995).
- Olszta M.J., Cheng X., Jee S.S., Kumar R., Kim Y., Kaufman M.J., Douglas E.P., Gower L.B., "Bone structure and formation: A new perspective", *Mater. Sci. Eng Rep.*, **58**(3-5), 77-116 (2007).
- Ong H., Loo J., Boey F., Russell S., Ma J., Peng K.-W., "Exploiting the high-affinity phosphonate-hydroxyapatite nanoparticle interaction for delivery of radiation and drugs", *J. Nanopart. Res.*, **10**(1), 141-150 (2008).
- Ouizat S., Barroug A., Legrouri A., Rey C., "Adsorption of bovine serum albumin on poorly crystalline apatite: influence of maturation", *Mater. Res. Bull.*, **34**(14-15), 2279-2289 (1999).

- Ouizat S., "Apatites d'intérêt biologique: Elaboration, traitement, maturation et adsorption", Thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Marrakech (2000).
- Ozawa H., Hoshi K., Amizuka N., "Current concepts of bone biomineralization", *J. Oral Biosci.*, **50**(1), 1-14 (2008).
- Palazzo B., Iafisco M., Laforgia M., Margiotta N., Natile G., Bianchi C.L., Walsh D., Mann S., Roveri N., "Biomimetic hydroxyapatite-drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties", *Adv. Func. Mater.*, **17**(13), 2180-2188 (2007).
- Pautard F.G.E., "A biomolecular survey of calcification", *Calcif. Tissues: proceedings*, 108-122 (1966).
- Penel G., Leroy G., Rey C., Bres E., "MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites", *Calcif. Tissue Int.*, **63**(6), 475-481 (1998).
- Penel G., Cau E., Delfosse C., Rey C., Hardouin P., Jeanfils J., Delecourt C., Lemaitre J., Leroy G., "Raman microspectrometry studies of calcified tissues and related biomaterials. Raman studies of calcium phosphate biomaterials", *Dent. Med. Probl.*, **40**(1), 37-43 (2003).
- Pettifor J., Marie P., Sly M., Bruyn D., Ross F., Isdale J., de Klerk W., van der Walt W., "The effect of differing dietary calcium and phosphorus contents on mineral metabolism and bone histomorphometry in young vitamin D-replete baboons", *Calcif. Tissue Inter.*, **36**(1), 668-676 (1984).
- Pham H., Luo P., Génin F., Dash A., "Synthesis and characterization of hydroxyapatite-ciprofloxacin delivery systems by precipitation and spray drying technique", *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **3**(1), 1-9 (2002).
- Rawls H.R., Bartels T., Arends J., "Binding of polyphosphonates at the water/hydroxyapatite interface", *J. Colloid Interface Sci.*, **87**(2), 339-345 (1982).
- Rawls H.R., Cabasso I., "Adsorption of polyphosphonated polyelectrolytes on hydroxyapatite", in " Adsorption on and surface chemistry hydroxyapatite" Ed. Misra D.N., Springer, New York & London, (1984).
- Redman-Furey N., Dicks M., Bigalow-Kern A., Cambron R.T., Lubey G., Lester C., Vaughn D., "Structural and analytical characterization of three hydrates and an anhydrate form of risedronate", *J. Pharm. Sci.*, **94**(4), 893-911 (2005).
- Rey C., Lian J., Grynopas M., Shapiro F., Zylberberg L., Glimcher M.J., "Non-apatitic environments in bone mineral: FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states", *Conn. Tissue Res.*, **21**(1), 267-273 (1989a).

- Rey C., Collins B., Goehl T., Dickson I.R., Glimcher M.J., "The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study", *Calcif. Tissue Inter.*, **45**(3), 157-164 (1989b).
- Rey C., "Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties", *Biomaterials*, **11**, 13-15 (1990).
- Rey C., Shimizu M., Collins B., Glimcher M.J., "Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: 2 Investigations in the ν_3 PO₄ domain", *Calcif. Tissue Inter.*, **49**(6), 383-388 (1991a).
- Rey C., Renugopalakrishnan V., Collins B., Glimcher M.J., "Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging", *Calcif. Tissue Inter.*, **49**(4), 251-258 (1991b).
- Rey C., Hina A., Amrah B., Ranz X., "Surface reactions of calcium-phosphate bioceramics, comparison with bone mineral surface chemistry", *Fourth Eur. Ceramics*, **8**, 301-312 (1995a).
- Rey C., Miquel J.L., Facchini L., Legrand A.P., Glimcher M.J., "Hydroxyl groups in bone mineral", *Bone*, **16**(5), 583-586 (1995b).
- Rey C., Hina A., Tofighi A., Glimcher M.J., "Maturation of poorly crystalline apatites: Chemical and structural aspects in vivo and in vitro", *Cells Mater.*, **5**(4), 345-356 (1995c).
- Rey C., Hina A., Somrani S., Jemal M., Glimcher M.J., "Chemical properties of poorly crystalline apatites", *Phosph. Res. Bull.*, **6**, 67-70 (1996).
- Rey C., Combes C., Drouet C., Lebugle A., Sfihi H., Barroug A., "Nanocrystalline apatites in biological systems: characterisation, structure and properties", *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*, **38**(12), 996-1002 (2007a).
- Rey C., Combes C., Drouet C., Sfihi H., Barroug A., "Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials", *Mater. Sci. Eng. C*, **27**(2), 198-205 (2007b).
- Rey C., Combes C., Drouet C., Glimcher M.J., "Bone mineral: update on chemical composition and structure", *Osteoporos. inter.*, **20**(6), 1013-1021 (2009).
- Reynolds E.C., Riley P.F., Storey E., "Phosphoprotein inhibition of hydroxyapatite dissolution", *Calcif. Tissue Int.*, **34** Suppl 2, S52-56 (1982).
- Rill C., Kolar Z.I., Kickelbick G., Wolterbeek H.T., Peters J.A., "Kinetics and thermodynamics of adsorption on hydroxyapatite of the [¹⁶⁰Tb]Terbium complexes of the bone-targeting ligands DOTP and BPPED", *Langmuir*, **25**(4), 2294-2301 (2009).

- Roach H.I., "Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption", *Cell. Biol. Int.*, **18**(6), 617-628 (1994).
- Rouahi M., Champion E., Gallet O., Jada A., Anselme K., "Physico-chemical characteristics and protein adsorption potential of hydroxyapatite particles: Influence on in vitro biocompatibility of ceramics after sintering", *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **47**(1), 10-19 (2006).
- Roufosse A.H., Aue W.P., Roberts J.E., Glimcher M.J., Griffin R.G., "Investigation of mineral phases of bone by solid-state phosphorus-31 magic-angle sample-spinning nuclear magnetic resonance", *Biochemistry*, **23**(25), 6115-6120 (1984).
- Roussière H., Montavon G., Laib S., Janvier P., Alonso B., Fayon F., Petit M., Massiot D., Bouler J.-M., Bujoli B., "Hybrid materials applied to biotechnologies: coating of calcium phosphates for the design of implants active against bone resorption disorders", *J. Mater. Chem.*, **15**(35-36), 3869-3875 (2005).
- Roussière H., Fayon F., Alonso B., Rouillon T., Schnitzler V., Verron E., Guicheux J., Petit M., Massiot D., Janvier P., Bouler J.-M., Bujoli B., "Reaction of zoledronate with β -tricalcium phosphate for the design of potential drug device combined systems", *Chem. Mater.*, **20**(1), 182-191 (2008).
- Russell R.G.G., Muhlbauer R.C., Bisaz S., Williams D.A., Fleisch H., "The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats", *Calcif. Tissue Res.*, **6**(3), 183-196 (1970).
- Russell R.G.G., Rogers M.J., "Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again", *Bone.*, **25**(1), 97-106 (1999).
- Russell R.G.G., Xia Z., Dunford J.E., Oppermann U., Kwaasi A., Hulley P.A., Kavanagh K.L., Triffitt J.T., Lundy M.W., Phipps R.J., Barnett B.L., Coxon F.P., Rogers M.J., Watts N.B., Ebetino F.H., "Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1117**, 209-257 (2007a).
- Russell R.G.G., "Determinants of structure-function relationships among bisphosphonates", *Bone*, **40**(5), S21-S25 (2007b).
- Russell R.G.G., "Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology", *Pediatrics*, **119**(2), S150-162 (2007c).

- Russell R.G.G., Watts N.B., Ebetino F.H., Rogers M.J., "Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy", *Osteoporos. Int.*, **19**(6), 733-759 (2008).
- Schüssele A., "Drug delivery to the bone-implant interface: Functional hydroxyapatite surfaces and particles", PhD of Natural Science, Faculty of Chemistry and Pharmacy, Regensburg (2007).
- Seshima H., Yoshinari M., Takemoto S., Hattori M., Kawada E., Inoue T., Oda Y., "Control of bisphosphonate release using hydroxyapatite granules", *J. Biomedical Mater. Res B: Appl. Biom.*, **78**(2), 215-221 (2006).
- Sharpe J.R., Sammons R.L., Marquis P.M., "Effect of pH on protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics", *Biomaterials*, **18**(6), 471-476 (1997).
- Shibusawa Y., Miwa N., Hirashima T., Matsumoto U., "Separation of Low Density and Very Low Density Lipoproteins from Human Serum by Hydroxyapatite Chromatography", *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **17**(6), 1203-1217 (1994).
- Sherrer P., *Gött. Narch.*, **2**, 98 (1918).
- Shimabayashi S., Fukuda H., Aoyama T., Nakagaki M., "Adsorption of phosphate ion by hydroxyapatite in water", *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3074-3081 (1982).
- Shimabayashi S., Tanizawa Y., Ishida K., "Effect of phosphorylated organic compound on the adsorption of bovine serum albumin by hydroxyapatite", *Chem. Pharm. Bull.*, **39**(9), 2183-2188 (1991).
- Shinoda H., Adamek G., Felix R., Fleisch H., Schenk R., Hagan P., "Structure-activity relationships of various bisphosphonates", *Calcif. Tissue Int.*, **35**(1), 87-99 (1983).
- Shinto Y., Uchida A., Korkusuz F., Araki N., Ono K., "Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics", *J Bone Joint Surg-British Volume*, **74**(4), 600 (1992).
- Sfihi H., Rey C., "Magnetic Resonance in Colloid and Interface Science", in "Nato ASI series II" Ed. Fraissard J., Lapina B., Kluwer Academic Publishers, 409-422 (2002).
- Socrates G., "Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts", John Wiley & Sons Inc, Brunel University, London (2004).
- Somasundaran P., Wang Y.H.C., "Surface chemical characteristics and adsorption properties of apatite", in " Adsorption on and surface chemistry of hydroxyapatite" Ed. Misra D.N., Plenum Press. New York and London, 129-150 (1984).
- Suzuki O., Yagishita H., Yamazaki M., Aoba T., "Adsorption of bovine serum albumin onto octacalcium phosphate and its hydrolyzates", *Cells Mater.*, **5**, 45-54 (1995).

- Tadic D., Peters F., Epple M., "Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites", *Biomaterials*, **23**(12), 2553-2559 (2002).
- Tadier S., "Etude des propriétés physico-chimiques et biologiques de ciments biomédicaux à bas de carbonate de calcium: apport de procédé de co-broyage", Thèse de Doctorat, INP, Toulouse (2009).
- Takami M., Suda K., Sahara T., Itoh K., Nagai K., Sasaki T., Udagawa N., Takahashi N., "Involvement of vacuolar H⁺-ATPase in incorporation of risedronate into osteoclasts", *Bone*, **32**(4), 341-349 (2003).
- Tanabe T., Aoba T., Moreno E.C., Fukae M., "Effect of fluoride in the apatitic lattice on adsorption of enamel proteins onto calcium apatites", *J. Dent. Res.*, **67**(3), 536-542 (1988).
- Tanaka H., Miyajima K., Nakagaki M., Shimabayashi S., "Incongruent dissolution of hydroxyapatite in the presence of phosphoserine", *Colloid Polymer Sci.*, **269**(2), 161-165 (1991).
- Termine J.D., Kleinman H.K., Whitson S.W., Conn K.M., McGarvey M.L., Martin G.R., "Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen", *Cell.*, **26**(1 Pt 1), 99-105 (1981).
- Thiebaud D., Burckhardt P., Melchior J., Eckert P., Jacquet A.F., Schnyder P., Gobelet C., "Two years' effectiveness of intravenous pamidronate (APD) versus oral fluoride for osteoporosis occurring in the postmenopause", *Osteoporos. Inter.*, **4**(2), 76-83 (1994).
- Tomazic B.B., Mayer I., Brown W.E., "Ion incorporation into octacalcium phosphate hydrolyzates", *J. Cryst. Growth*, **108**(3-4), 670-682 (1991).
- Trechsel U., Schenk R., Bonjour J., Russell R., Fleisch H., "Relation between bone mineralization, Ca absorption, and plasma Ca in phosphonate-treated rats", *Amer. J. Physiol.-Endocrin. & Metab.*, **232**(3), E298 (1977).
- Trombe J.C., "Contribution à l'étude de la décomposition et la réactivité de certaines apatites hydroxylées carbonatées ou fluorées alcalino-terreuses", Thèse d'Etat, Université Paul Sabatier, Toulouse (1972).
- Vallano P.T., Shugarts S.B., Kline W.F., Woolf E.J., Matuszewski B.K., "Determination of risedronate in human urine by column-switching ion-pair high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection", *J. Chrom. B.*, **794**(1), 23-33 (2003).
- Van Beek E.R., Cohen L.H., Leroy I.M., Ebetino F.H., Löwik C., Papapoulos S.E., "Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates", *Bone*, **33**(5), 805-811 (2003).

- Vanthuyne M., Maes A., "The removal of heavy metals from contaminated soil by a combination of sulfidisation and flotation", *Sci. Total Envir.*, **290**(1-3), 69-80 (2002).
- Vechasilp J., Tangtrakulwanich B., Oungbho K., Yuenyongsawad S., "The efficacy of methotrexate-impregnated hydroxyapatite composites on human mammary carcinoma cells", *J. Orthop. Surg.*, **15**(1), 56-61 (2007).
- Verron E., Khairoun I., Guicheux J., Bouler J.M., "Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review", *Drug Discovery Today.*, **15**, 547-552 (2010).
- Vignoles M.M., "Contribution à l'étude des apatites carbonatées de type B", Thèse d'Etat, INP, Toulouse (1984).
- Vignoles M., Bonel G., Holcomb D.W., Young R.A., "Influence of preparation conditions on the composition of type B carbonated hydroxyapatite and on the localization of the carbonate ions", *Calcif. Tissue Inter.*, **43**(1), 33-40 (1988).
- Vitha T., Kubicek V., Hermann P., Kolar Z.I., Wolterbeek H.T., Peters J.A., Lukes I., "Complexes of DOTA-bisphosphonate conjugates: probes for determination of adsorption capacity and affinity constants of hydroxyapatite", *Langmuir*, **24**(5), 1952-1979 (2008).
- Voegel J.C., Frank R.M., "Adsorption of benzenecarboxylic acids onto hydroxyapatite and human enamel powder", *J. Colloid Interface Sci.*, **83**(1), 26-34 (1981).
- Wang L., Nancollas G.H., "Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution", *Chemi. Rev.*, **108**(11), 4628-4669 (2008).
- Wassell D.T.H., Hall R.C., Embery G., "Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite", *Biomaterials*, **16**(9), 697-702 (1995).
- Watts N.B., Chines A., Olszynski W.P., McKeever C.D., McClung M.R., Zhou X., Grauer A., "Fracture risk remains reduced one year after discontinuation of risedronate", *Osteoporos. Inter.*, **19**(3), 365-372 (2008).
- Weiss W., Ranke W., "Surface chemistry and catalysis on well-defined epitaxial iron-oxide layers", *Prog Surface Sci.*, **70**(1-3), 1-151 (2002).
- Wright A.O., Seltzer M.D., Gruber J.B., Chai B.H.T., "Site selective spectroscopy and determination of energy levels in Eu³⁺ doped strontium fluorophosphate", *J. Appl. Phys.*, **78**(4), 2456-2467 (2009).
- Wu L.N., Genge B.R., Dunkelberger D.G., LeGeros R.Z., Concannon B., Wuthier R.E., "Physicochemical characterization of the nucleational core of matrix vesicles", *J. Biol. Chem.*, **272**(7), 4404-4411 (1997).

- Wu W., Nancollas G., "Determination of interfacial tension from crystallization and dissolution data: a comparison with other methods", *Adv. Colloid Interface Sci.*, **79**(2-3), 229-279 (1999).
- Yesinowski J.P., Eckert H., "Hydrogen environments in calcium phosphates: Proton MAS NMR at high spinning speeds", *J. Amer. Chem. Soc.*, **109**(21), 6274-6282 (1987).
- Yoshida M., Tokuda H., Ishisaki A., Kanno Y., Harada A., Shimuzu K., Kozawa O., "Tiludronate inhibits prostaglandin F2 [alpha]-induced vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts", *Molec. Cellu. Endoc.*, **236**(1-2), 59-66 (2005).
- Zahidi E., "Etude du système phosphate de calcium-amino, 2 éthyl phosphate de calcium, en milieu eau/éthanol", Thèse de 3^{ème} Cycle, INP, Toulouse (1984).
- Zayane S., "Evaluation des granules du phosphate dicalcique di-hydraté- phosphate Tricalcique- β , chargés de gentamicine, dans le traitement local de l'ostéite expérimentale à *Staphylococcus aureus*", Thèse de doctorat, Université François Rabelais, Tours (2010).

ANNEXES

DESCRIPTION DES TECHNIQUES D'ANALYSES UTILISEES

I- ANALYSES CHIMIQUES

I-1- Dosages du calcium, phosphate et carbonate dans les solides

La solution mère pour le dosage du calcium et du phosphore dans les solides a été préparée comme suit: 100 mg de solide à analyser sont introduits dans une fiole de 100 ml puis additionnés de 5 ml d'une solution d'acide perchlorique (6 M). Après dissolution complète, le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau désionisée.

I-1-1- Dosage du calcium

Le calcium a été dosé par volumétrie en retour (Charlot, 1966). L'agent complexant est le sel disodique de l'éthylène diamine tétra acétique (EDTA) en présence d'ammoniaque. L'excès de l'EDTA est ensuite dosé par une solution titrée de chlorure de zinc. L'indicateur de virage est le noir d'ériochrome T (virage de la coloration bleu au rose). L'erreur relative sur la teneur en calcium est de l'ordre de 0,5 %.

I-1-2- Dosage des ions orthophosphate

Les ions orthophosphate ont été dosés par colorimétrie (Charlot, 1966). Le principe de cette méthode consiste à mesurer la densité optique (absorbance) de la coloration jaune du complexe phosphovanadomolybdique $\text{VO}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$, en milieu acide, à une longueur d'onde $\lambda = 460 \text{ nm}$. Le réactif colorimétrique est préparé en mélangeant dans la proportion 50/50 % en volume, une solution de molybdate d'ammonium (80 g/l) et une solution de monovanadate d'ammonium (4 g/l). Les absorbances des différentes solutions ont été mesurées, dans des cuves en quartz, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible BECKMAN type 24 à double faisceau. La précision du dosage du phosphore est de l'ordre de 0,5 %.

I-1-3- Dosage de carbonates

Les ions carbonate contenus dans le solide ont été dosés avec un coulomètre UIC Coulometrics. L'attaque de l'échantillon (50 mg) par l'acide perchlorique (2 M) produit un dégagement de CO_2 entraîné par un flux d'air, préalablement débarrassé du dioxyde de carbone par bullage dans une solution de KOH à 70 %.

Le dioxyde de carbone provenant de l'échantillon bulle dans la cellule coulométrique de pH. Le CO_2 réagit avec l'éthanolamine pour former un acide fort qui provoque l'atténuation de la couleur bleue de l'indicateur. Une cellule photoélectrique détecte la diminution de la densité optique et commande la régénération

électrochimique de la solution cathodique afin de la ramener à sa coloration d'origine (100 % en transmission). La quantité de courant nécessaire à cette opération coulométrique est intégrée et transformée en mg de carbone. Le pourcentage massique en carbone est donné par la relation :

$$\% \text{CO}_3 = 0,5.X/m$$

où X désigne la quantité de carbone (mg) donnée par l'appareil et m la masse de l'échantillon utilisée (mg). L'erreur relative sur la mesure est de l'ordre de 1%.

I-2- Dosage du calcium et de phosphate dans les solutions d'adsorption

I-2-1- Dosage du calcium

Le calcium présent dans les surnageants avant et après adsorption a été dosé par spectrométrie d'émission optique par plasma à couplage inductif (ICP/OES). C'est une technique d'analyse multiélémentaire qui sert à la détermination et au dosage de plus de 50 éléments. L'échantillon liquide est nébulisé puis transmis vers le plasma d'argon (6000°C). Il subit différentes étapes de décomposition, d'atomisation et d'ionisation conduisant à une excitation des atomes et des ions. Après excitation, les atomes contenus dans l'échantillon émettent de la lumière dont la longueur d'onde leur est caractéristique. La lumière est transmise par l'intermédiaire du système optique (réseau + prisme) vers un détecteur, qui permet le dosage. Cette technique est très sensible et permet d'atteindre des teneurs de l'ordre de quelques parties par billion (ppb).

I-2-2- Dosage des ions phosphate

La teneur en ions phosphate dans les filtrats obtenus avant et après adsorption a été dosée par colorimétrie (Charlot, 1966) selon le même protocole expérimental adopté pour les solides. Ces dosages ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Hewlett Packard 8452A Diode Array.

I-3- Dosage du risédronate

La spectroscopie UV-visible a été utilisée pour déterminer la quantité en risédronate dans les solutions d'adsorption ; elle est également mise à profit pour estimer les teneurs de risédronate contenues dans les sels de risédronate de calcium précipités, et après dissolution en milieu acide nitrique.

Les molécules de risédronate présentent un maximum d'absorption (λ_{max}) du rayonnement UV à 262 nm. Cette longueur d'onde correspond aux groupements pyridine de la molécule d'adsorbat. La concentration du risédronate a été déterminée en utilisant la loi de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l$$

A: absorbance,

ε : coefficient d'extinction molaire (cm²/mol),

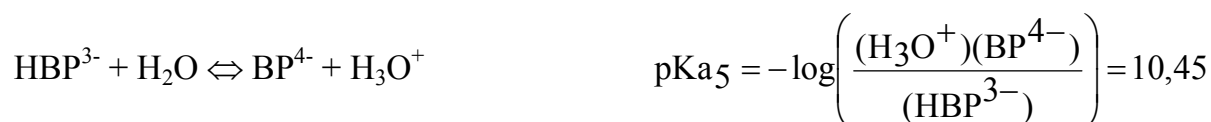
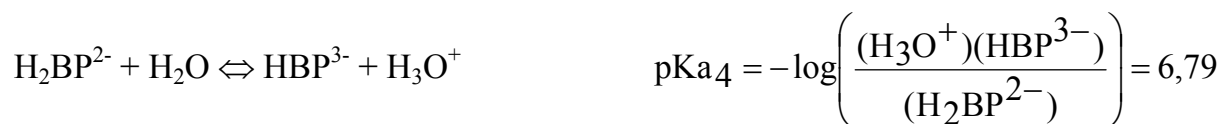
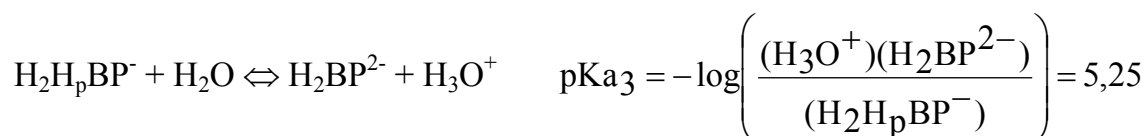
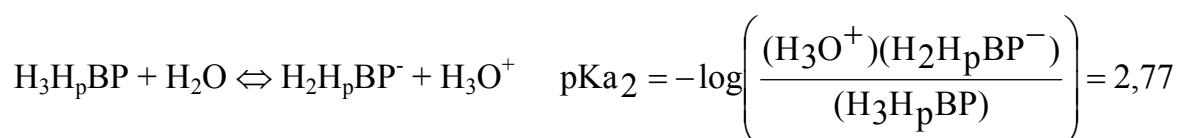
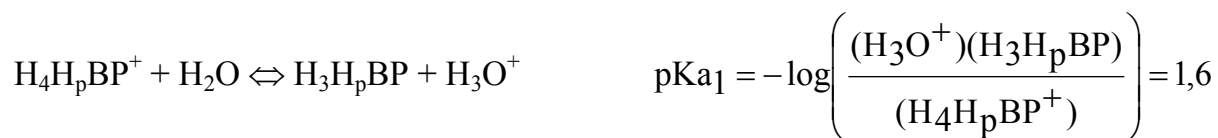
l: distance (cm) parcourue par le faisceau lumineux dans l'échantillon,

C: concentration de l'adsorbat (mol/l)

Une courbe d'étalonnage a été établie, pour chaque cas étudié, après dissolution du sel monosodique du risédronate dans un milieu correspondant à l'adsorption et couvrant la gamme de 0 à 0,3 mM. Le coefficient d'extinction molaire du risédronate (ε) déterminé à partir de l'ensemble des droites obtenues est de $(3,77 \pm 0,01) \cdot 10^3$ L.mol⁻¹.cm⁻¹. Il est proche de $3,90 \times 10^3$ L.mol⁻¹.cm⁻¹, valeur rapportée dans la littérature (Vallano et al., 2003).

I-4- Diagramme de spéciation du risédronate

Pour la réalisation du diagramme de spéciation (fraction des espèces ioniques en fonction du pH) nous avons tenu en compte les différents équilibres de dissociation du risédronate en solution et des constantes d'acidité correspondantes (pK_a) à 37°C:



La méthode consiste à exprimer les différentes fractions des espèces ioniques du risédronate en fonction des constantes d'acidité (K_{a_i}) et des concentrations en ions

hydronium (H_3O^+). Pour cela, l'équation de la conservation de masse doit être prise en compte pour résoudre le système :

$$(BP)_{\text{total}} = (BP^{4-}) + (HBP^{3-}) + (H_2BP^{2-}) + (H_2H_pBP^-) + (H_3H_pBP) + (H_4H_pBP^+)$$

Ainsi le pourcentage des espèces ioniques du bisédronate peut être exprimé de la façon suivante après résolution du système:

$$\begin{aligned} \%(BP^{4-}) &= \frac{100}{A_1} \quad ; \quad \%(HBP^{3-}) = \frac{100}{A_2} \quad ; \quad \%(H_2BP^{2-}) = \frac{100}{A_3} \quad ; \\ \%(H_2H_pBP^-) &= \frac{100}{A_4} \quad ; \quad \%(H_3H_pBP) = \frac{100}{A_5} \quad ; \quad \%(H_4H_pBP^+) = \frac{100}{A_6} \end{aligned}$$

Avec

$$\begin{aligned} A_1 &= 1 + \frac{(H_3O^+)}{Ka_5} + \frac{(H_3O^+)^2}{Ka_4Ka_5} + \frac{(H_3O^+)^3}{Ka_3Ka_4Ka_5} + \frac{(H_3O^+)^4}{Ka_2Ka_3Ka_4Ka_5} + \frac{(H_3O^+)^5}{Ka_1Ka_2Ka_3Ka_4Ka_5} \\ A_2 &= 1 + \frac{Ka_5}{(H_3O^+)} + \frac{(H_3O^+)}{Ka_4} + \frac{(H_3O^+)^2}{Ka_3Ka_4} + \frac{(H_3O^+)^3}{Ka_2Ka_3Ka_4} + \frac{(H_3O^+)^4}{Ka_1Ka_2Ka_3Ka_4} \\ A_3 &= 1 + \frac{Ka_4Ka_5}{(H_3O^+)^2} + \frac{Ka_4}{(H_3O^+)} + \frac{(H_3O^+)}{Ka_3} + \frac{(H_3O^+)^2}{Ka_2Ka_3} + \frac{(H_3O^+)^3}{Ka_1Ka_2Ka_3} \\ A_4 &= 1 + \frac{Ka_3Ka_4Ka_5}{(H_3O^+)^3} + \frac{Ka_3Ka_4}{(H_3O^+)^2} + \frac{Ka_3}{(H_3O^+)} + \frac{(H_3O^+)}{Ka_2} + \frac{(H_3O^+)^2}{Ka_1Ka_2} \\ A_5 &= 1 + \frac{Ka_2Ka_3Ka_4Ka_5}{(H_3O^+)^4} + \frac{Ka_2Ka_3Ka_4}{(H_3O^+)^3} + \frac{Ka_2Ka_3}{(H_3O^+)^2} + \frac{Ka_2}{(H_3O^+)} + \frac{(H_3O^+)}{Ka_1} \\ A_6 &= 1 + \frac{Ka_1Ka_2Ka_3Ka_4Ka_5}{(H_3O^+)^5} + \frac{Ka_1Ka_2Ka_3Ka_4}{(H_3O^+)^4} + \frac{Ka_1Ka_2Ka_3}{(H_3O^+)^3} + \frac{Ka_1Ka_2}{(H_3O^+)^2} + \frac{Ka_1}{(H_3O^+)} \end{aligned}$$

II- Diagrammes des rayons X (DRX)

Les diagrammes de diffraction des rayons X ont été obtenus à l'aide d'un diffractomètre à compteur courbe CPS 120 INEL couplé à une interface et à un ordinateur, utilisant le rayonnement $K\alpha_1$ émis par une anticathode au cobalt ($\lambda = 1,78892 \text{ \AA}$).

Les dimensions apparentes des cristallites ont été déterminées à l'aide de la formule de Sherrer (1918) en utilisant les raies (002) et (310).

$$L_{(hkl)} = \frac{0,94\lambda}{\cos\theta\sqrt{\Delta_r^2 - \Delta_o^2}}$$

Avec:

0,94: Constante de Sherrer

L: Taille des cristallites en Angstrom (\AA)

λ : Longueur d'onde (1,78892 \AA)

θ : Angle de diffraction correspondant à la raie hkl considérée

Δ_r : Largeur d'une raie de diffraction de l'échantillon

Δ_0 : Largeur de la même raie de diffraction d'une hydroxyapatite calcinée à 900°C.
Elle vaut 0,00128 rd pour la raie (002).

L'erreur absolue sur les dimensions des cristallites est estimée à environ 5 \AA .

III- Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

L'analyse par spectroscopie d'adsorption infrarouge a été réalisée dans l'intervalle 400-4000 cm^{-1} à l'aide d'un spectromètre Nicolet 5700 sur des pastilles transparentes. Ces dernières ont été obtenues en dispersant 1 mg de produit dans 300 mg de bromure de potassium KBr (Prolabo, pour spectroscopie IR). Le mélange a été ensuite compacté sous vide (~ 1 torr) en appliquant une pression de 14 tonnes. cm^{-2} .

L'avantage de cette technique repose sur l'utilisation de procédés de transformé de fourrier qui permet l'arrivée au détecteur de tous les éléments spectraux transmis par l'échantillon. Ceux-ci doivent être traités un par un dans les systèmes dispersifs. Il en résulte une grande rapidité d'acquisition des données et une amélioration du rapport (Signal/Bruit) par unité de temps. Ainsi les signaux peuvent être traités mathématiquement (déconvolution, interpolation, décomposition, dérivés...).

III-1- Décomposition

La décomposition (ou curve fitting) permet de reconstituer le massif original en retrouvant ses différentes composantes ; c'est une technique qui peut permettre en principe une qualification des spectres. Dans notre étude, la décomposition a été réalisée à l'aide d'un logiciel de décomposition des bandes IR (Galactics Gram 32). Ces décompositions ont été réalisées en considérant une forme lorentzienne des bandes infrarouge. La position des bandes a été déterminée d'après les différentes études effectuées dans ce domaine.

VI- Spectroscopie de diffusion RAMAN

La spectroscopie Raman est une technique complémentaire à l'infrarouge. La nature différente des deux processus d'interaction à l'origine de l'effet Raman et de l'infrarouge (absorption, réflexion ou émission) fait que certaines vibrations seront seulement actives en infrarouge et d'autres seulement actives en Raman (règle d'exclusion mutuelle), alors que d'autres le seront pour les deux ou pour aucune.

La spectroscopie Raman fournit en effet des informations de natures différentes. Elle permet de caractériser aussi bien l'ordre structural (à courte, moyenne ou grande distance) ainsi que le type de liaison d'un composé et sa structure cristalline. Il s'agit de la méthode spectroscopique dotée de la meilleure résolution (un micron) pour l'identification et la caractérisation de composés ou de phases. Sa capacité à identifier les systèmes amorphes est également inégalée.

En spectrométrie Raman, l'analyse se fait par excitation du matériau. Porté à un niveau énergétique virtuel par une puissante source lumineuse monochromatique de type laser, le matériau réémet ensuite une radiation qui est collectée puis analysée par un détecteur adéquat. Cette radiation comporte deux types de signaux. Le premier très majoritaire correspond à la diffusion Rayleigh : la radiation incidente étant diffusée élastiquement sans changement d'énergie. Le second correspond à des photons en nombre très limité pouvant interagir avec la matière. Celle-ci absorbe (ou cède) de l'énergie aux photons incidents produisant ainsi les radiations Stokes (ou anti-Stokes). La variation d'énergie observée sur le photon nous renseigne alors sur les niveaux énergétiques de rotation et de vibration de la molécule concernée.

L'acquisition des spectres Raman a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de type Jobin Yvon LabRam HR, équipé d'un objectif de 100X. Le spot à la surface de l'échantillon est focalisé sur un diamètre d'environ 2 μm , ce qui améliore le pouvoir de résolution. La source laser (Hélium/Néon) utilisée est à 632,8 nm.

V- Résonance Magnétique Nucléaire

V-1- RMN de l'état solide

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) de l'état solide est un moyen d'investigation particulièrement puissant pour déterminer l'environnement local des atomes dotés d'un moment magnétique nucléaire. Dans le cas des apatites, les noyaux les plus observés sont ceux de l'hydrogène (^1H), du carbone (^{13}C), du fluor (^{19}F) et du phosphore (^{31}P). Tous ces noyaux sont dotés d'un moment cinétique de spin demi-entier ($I = 1/2$).

Nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce travail uniquement à la RMN du proton (^1H) et du phosphore (^{31}P). Toutes les mesures ont été réalisées sur un spectromètre Bruker ASX 500 opérant dans un champ magnétique de 11,7 T (Teslas). Les fréquences de résonance du ^1H et du ^{31}P correspondant à cette valeur du champ sont de 500,13 et 202,47 MHz. Une rotation à l'angle magique (MAS) a été effectuée pour tous les échantillons. Il est à noter que le MAS permet de moyenniser à zéro l'anisotropie de déplacement chimique, ce qui donne lieu à une haute résolution. Les expériences de polarisation croisée (CP) $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ ont été réalisées à un temps de

contact de 5 ms. Cette technique est utilisée pour distinguer les groupements phosphore proche des protons, et plus particulièrement les ions hydrogénophosphate (HPO_4^{2-}).

Les déplacements chimiques du proton et du phosphore ont été étalonnés avec un mélange de tétraméthyl silane (TMS) et d'acide phosphorique (85 %). Les échantillons sont placés dans un rotor de zirconium tournant à vitesse comprise entre 12 et 14 kHz.

V-2- RMN en solution

Nous avons utilisé le Bruker Spectrospin DPX de 200 MHz équipé d'une sonde QNP de 5 mm pouvant réaliser des spectres proton carbone, phosphore et fluor. Pour cela un volume de solution d'adsorption (100 μl) a été ajouté à 0,4 ml d'une solution de KCl (1 mM) puis introduit dans un tube à RMN. Les spectres RMN ^{31}P ont été réalisés en utilisant comme étalon interne une solution di-hydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) à 2 %.

VI- Mesure de Surface spécifique

La surface spécifique des poudres lyophilisées a été mesurée par la méthode de Brunauer-Emmet-Teller (BET) multipoint avec un appareil Quantachrome Nova 1000. Cette méthode est basée sur l'adsorption et la désorption d'azote ultra pur. Avant d'effectuer les mesures, nous avons procédé au dégazage (au moins 12 h) à température ambiante pour les apatites nanocristallines et à environ 100°C pour l'apatite bien cristallisée. Les tests expérimentaux ont été effectués en plusieurs points afin d'obtenir des résultats précis. L'appareil donne la valeur de la surface mesurée ; la surface spécifique de l'échantillon est ensuite calculée d'après l'équation suivante :

Surface spécifique (m^2/g) = surface mesurée (m^2) / masse de l'échantillon introduite pesée (g)

L'erreur relative sur la mesure est de l'ordre de 5%.

VII- Microscopie Electronique

VII-1- Microscopie Electronique à Transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) est un outil de caractérisation des matériaux solides à l'échelle (sub-)nanométrique. Le MET offre la possibilité de réaliser des images de hautes résolution et de recueillir des diagrammes de diffraction pour des petits grains ou cristaux.

Pour notre travail, les cristaux sont dispersés dans une solution d'éthanol dans un bain à ultrasons. Une goutte de cette suspension est ensuite déposée sur une grille de cuivre surmontée d'un film de colodium contenant du carbone pour rendre les

échantillons conducteurs. L'appareil utilisé est un Jeol Jem 2100F. La tension d'accélération des électrons appliquée est comprise entre 480 et 3200 kV.

VII-2- Microscopie Electronique à Balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) est un outil de caractérisation en haute résolution de la surface d'objets dont la taille est comprise entre une dizaine de nanomètres et quelques millimètres. Son principe repose principalement sur la détection d'électrons rétrodiffusés par l'échantillon.

Une faible quantité de poudre est déposée sur une bande de scotch double face collée sur un porte-échantillon en aluminium. Les échantillons sont ensuite métallisés à l'argent afin d'éviter le phénomène de charge de surface dû au faisceau d'électrons. L'ensemble est placé dans un microscope Leo 435 VP monté avec un détecteur à scintillation (détection des électrons secondaires).

VIII- Analyse Thermique Gravimétrique (ATG) et Différentielle (ATD)

Les analyses thermogravimétriques en température croissante ont été réalisées à l'aide d'une thermobalance SETSYS Evolution couplant l'ATG et l'ATD.

L'échantillon ((environ $30,00 \pm 0,01$ mg) est placé dans une nacelle en platine. Les analyses thermiques sont enregistrées entre 20 et 1000 °C, sous air, avec une vitesse de montée en température de $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

IX- Conductimétrie

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un conductimètre digital de type LF 340/SET disposant d'une cellule de mesure de conductivité de type Tetracon 325. Ce conductimètre dispose de quatre gammes de sensibilité permettant des mesures entre 0 et $200 \text{ ms}\cdot\text{cm}^{-1}$ avec une précision de 0,05 % du maximum de la gamme utilisée (gammes disponibles : 200 μS , 2000 μS , 200 mS et 2000 mS).

Les mesures ont été effectuées à 37°C avec un bain thermostaté, muni d'un agitateur magnétique non chauffant. Le suivi du pH du milieu est réalisé à l'aide d'un pH mètre digital disposant d'une électrode de mesure de type Sentix-4. L'ajout (manuellement ou par débit pré-défini) des solution titrantes (nitrates de calcium) a été effectué via une microburette automatique de type schott T80/20 possédant une télécommande. La précision d'un ajout est de l'ordre de 1 μl .