# Oxalates de calcium et hydroxyapatite : des matériaux synthétiques et naturels étudiés par techniques RMN et DNP

César Leroy

▶ **To cite this version:**

César Leroy. Oxalates de calcium et hydroxyapatite : des matériaux synthétiques et naturels étudiés par techniques RMN et DNP. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066256 . tel-01443727

**HAL Id: tel-01443727**

**https://theses.hal.science/tel-01443727**

Submitted on 23 Jan 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Université Pierre et Marie Curie

ED 397. Physique et Chimie des Matériaux

*Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris / Equipe SMiLES*

# Oxalates de calcium et hydroxyapatite : des matériaux synthétiques et naturels étudiés par techniques RMN et DNP

Par César Leroy

Thèse de doctorat de Chimie de l'Université Pierre et Marie Curie - Paris 6

Dirigée par Christian Bonhomme

Présentée et soutenue publiquement le 05/10/2016

Devant un jury composé de :

| | | |
|---|---|---|
| M. Laurent DELEVOYE | *Directeur de Recherche* | Rapporteur |
| M. Franck FAYON | *Directeur de Recherche* | Rapporteur |
| Mme Christèle COMBES | *Professeur* | Examinatrice |
| Mme Melinda DUER | *Professeur* | Examinatrice |
| M. Olivier LEQUIN | *Professeur* | Examinateur |
| Mme Florence BABONNEAU | *Directeur de Recherche* | Examinatrice |
| M. Christian BONHOMME | *Professeur* | Directeur de thèse |

## SOMMAIRE :

**ABREVIATIONS ..... 4**

**INTRODUCTION GENERALE ..... 7**

**CHAPITRE 1: SYNTHESES ET CARACTERISATIONS DES MATERIAUX D'INTERET : OXALATES ET PHOSPHATES DE CALCIUM ..... 21**

**1. Les oxalates de calcium, $CaC_2O_4 \cdot nH_2O$ ..... 21**
a) Les différentes phases d'oxalates de calcium hydratés ..... 22
b) Produits thermodynamiques et cinétiques ..... 28
c) Synthèses mises en œuvre ..... 29
d) Méthodes de caractérisation ..... 32

**2. Apatite et apatites substituées ..... 48**
a) Structures hexagonale et monoclinique ..... 48
b) Substitutions et rôle des carbonates ..... 51
c) Synthèses mises en œuvre ..... 52
d) Méthodes de caractérisation ..... 53

**CHAPITRE 2: RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE ET *DYNAMIC NUCLEAR POLARIZATION* ..... 67**

**1. RMN à l'état solide : généralités ..... 69**
a) Interactions pour un spin I = ½ ..... 70
b) Noyaux quadripolaires : spécificités ..... 73

**2. Rotation à l'angle magique ..... 77**
a) Déplacement chimique et anisotropie de déplacement chimique (Chemical Shift Anisotropy *CSA*) ..... 77
b) Interaction dipolaire directe D ..... 79
c) Interaction quadripolaire ..... 79
d) Ultra hauts champs magnétiques et ultra haute fréquence de rotation MAS ..... 83

**3. Séquences d'impulsions ..... 83**
a) *High Power DECoupling* (HPDEC) ..... 83
b) *Cross Polarization* (CP) ..... 84
c) *HETeronuclear CORrelation* (HETCOR) et *Decoupling Using Mind-Boggling Optimization* (DUMBO) ..... 85
d) Saturation-récupération ..... 86

**4. *Dynamic Nuclear Polarization* (DNP) ..... 86**
a) Bref historique ..... 88
b) Eléments de théorie ..... 89
c) Tendances actuelles de la DNP MAS ..... 91
d) Méthodologie et préparation des échantillons ..... 92
e) Avantages et inconvénients de l'expérience DNP ..... 93

**5. Calculs *ab initio* de paramètres RMN ..... 95**

a) Théorie de la fonctionnelle de la densité ..... 95
b) Les différentes approximations ..... 96
c) Ondes planes et approximation des pseudopotentiels ..... 97
d) Déplacement chimique : approche GIPAW (*Gauge Including Projector Augmented Wave*) ..... 97

**CHAPITRE 3: RMN ET DNP MULTINUCLEAIRE APPLIQUEES AUX COMPOSES SYNTHETIQUES : OXALATES DE CALCIUM HYDRATES ET HYDROXYAPATITE ..... 109**

**1. Autour des oxalates de calcium hydratés ..... 110**
a) Caractérisation par RMN des phases d'oxalates de calcium hydratés ..... 110
b) Effets de la température et de la pression sur les spectres RMN de COM, COD et COT ..... 117

**2. Autour de l'hydroxyapatite (HAp) et des HAp substituées ..... 128**
a) Approche par RMN $^{1}H$, $^{31}P$ et $^{13}C$ MAS/CP MAS en phase solide ..... 129
b) Noyaux quadripolaires : RMN $^{23}Na$ et $^{43}Ca$ MAS en phase solide ..... 133

**3. Augmentation de sensibilité par DNP MAS : mise en place des protocoles expérimentaux à partir de CHAp ..... 134**
a) Choix du solvant et du biradical (« DNP juice ») ..... 134
b) Expériences 2D DNP CP MAS double et triple résonances ..... 137
c) Expériences 2D $^{13}C$ DNP CP MAS double et triple résonances en *abondance naturelle* ..... 145
d) Expériences 2D $^{43}Ca$ DNP CP MAS double et en *abondance naturelle* ..... 147

**4. Augmentation de sensibilité par DNP MAS : oxalates de calcium hydratés synthétiques, $CaC_2O_4 \cdot nH_2O$ ..... 160**
a) Recherche d'un couple {solvant/biradical} compatible avec les phases COM, COD et COT ..... 161
b) Interprétation des cartes 2D $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ DNP HETCOR CP MAS : cas du COM ..... 162

**5. Conclusion ..... 164**

**CHAPITRE 4: RMN ET DNP MULTINUCLEAIRE APPLIQUEES AUX CALCIFICATIONS PATHOLOGIQUES : CALCULS RENAUX ET PLAQUE DE RANDALL ..... 173**

**1. Caractérisations usuelles des calculs rénaux ..... 174**
a) La spectroscopie FTIR : un outil courant de diagnostic médical ..... 174
b) Diffraction des rayons X sur poudre ..... 175

**2. Les méthodes de RMN appliquées aux calculs rénaux ..... 176**
a) Caractérisation des phases par RMN $^{1}H$, $^{13}C$, $^{43}Ca$, $^{29}Si$ et $^{27}Al$ ..... 176
b) Etude par RMN de la matrice organique : échantillon KS 3 ..... 184
c) Les phosphates de "trame" : étude par RMN $^{31}P$ MAS et CP MAS ..... 186
d) "La" plaque de Randall : un challenge spectroscopique ..... 189

**3. RMN DNP MAS : applications à l'étude des calculs rénaux et de la plaque de Randall ..... 193**
a) KS 3 : un prototype pour les études par DNP CP MAS ..... 193
b) Etude d'une *unique* plaque de Randall par RMN DNP CP MAS. ..... 195

**4. Conclusion ..... 199**

**CHAPITRE 5: VERS DES SYNTHESES EN LIEN AVEC LES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES RESPONSABLES DES CALCIFICATIONS PATHOLOGIQUES ..... 207**

**1. Etude de quelques chélatants de l'ion calcium ..... 207**
a) Synthèses en gel ..... 207
b) Rôle des citrates ..... 214
c) Interactions du thé vert avec les oxalates de calcium ..... 225

**2. Croissance d'oxalates de calcium en surface d'hydroxyapatite ..... 234**
a) Synthèse de sphères micrométriques d'hydroxyapatite ..... 235
b) Résultats ..... 237

**3. Synthèses en conditions microfluidiques ..... 247**
a) Contexte des travaux ..... 247
b) Résultats obtenus en synthèse microfluidique ..... 248

**4. Conclusion ..... 253**

**CONCLUSION GENERALE ..... 259**

# Abréviations

ACO : Oxalate de calcium amorphe
Ca : Calcium
CHAp : Hydroxyapatite carbonatée
COAnh : Oxalate de calcium anhydre
COD : Oxalate de calcium dihydraté
COM : Oxalate de calcium monohydraté
COT : Oxalate de calcium trihydraté
CP : Polarisation croisée
DFT : Théorie de la fonctionnelle de la densité
DNP : Polarisation nucléaire dynamique
DRX : Diffraction des rayons X
FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GIPAW : Gauge Including Projector Augmented Waves
HAp : Hydroxyapatite
HETCOR : Corrélation hétéronucléaire
HPDEC : Découplage haute puissance
KS : Calcul rénal
MAS : Rotation à l'angle magique
MEB : Microscope élecrotonique à balayage
MET : Microscope électronique en transmission
MW : Microondes
Ox : Oxalate
PR : Plaque de Randall
RMN : Résonance magnétique nucléaire

# Introduction Générale

# Introduction générale

La lithiase, du grec *lithos* signifiant pierre, est un mal ancestral. Les premiers cas avérés remontent à l'Egypte antique, certaines momies présentent en effet des reliquats de calcifications pathologiques [1]. Communément appelé calcul rénal, on peut relever à travers l'histoire de nombreux cas célèbres, et bien que désormais traitée efficacement médicalement, la lithiase a eu un impact important voire même surprenant sur plusieurs faits historiques. On peut citer par exemple le philosophe Epicure, qui d'après Hermarque (Lettres d'Hermarque), mourut de rétention urinaire causée par des calculs rénaux. Napoléon III quant à lui souffrait de lithiase vésicale, ce mal compromit grandement sa capacité à gouverner notamment lors de la guerre contre l'empire Prusse : il décède lors d'une tentative d'opération [2]. Un témoignage célèbre sur cette maladie nous vient de Montaigne, atteint de la gravelle (nom donné à l'époque à la lithiase urinaire). Il dépeint ses douleurs et symptômes dans ses nombreux essais : "*L'opiniâtreté de mes pierres, spécialement en la verge, m'a parfois jeté en longues suppressions d'urine, de trois, de quatre jours : et si avant en la mort, que c'eût été folie d'espérer l'éviter, voire désirer, vu les cruels efforts que cet état m'apporte*." [3]. Il mourut à 59 ans probablement de cette maladie, après une dizaine d'années de douleurs et de tentatives de traitements. Ramsès II, Anne de Bretagne, Isaac Newton, Charles Darwin, Benjamin Franklin,… tous ces personnages ont en commun d'avoir souffert de lithiase au cours de leur vie. De nos jours, les progrès médicaux et scientifiques ont permis une avancée remarquable dans les traitements et diagnostics de la maladie. En France, 9,8 % de la population de plus de 45 ans a déjà vécu un épisode de lithiase urinaire. Il est intéressant de noter que la prévalence de la lithiase urinaire dépend de la classe socio-économique du patient. Dans la population à haut niveau socio-économique, ayant des régimes alimentaires variés, bien souvent complétés par de nombreuses protéines animales et un cadre sanitaire sain, les calculs rénaux apparaissent assez tardivement (entre 30 et 60 ans). Dans des populations à niveau de vie plus faible, la lithiase se développe dès l'enfance, majoritairement chez l'homme à cause d'une hygiène de vie plus aléatoire et une diversité alimentaire pauvre (en céréales, végétaux…) [4]. Le traitement des lithiases urinaires est difficilement chiffrable. Cependant, il peut être estimé à environ 850 000 000 € si on se base sur les prédictions faites en Allemagne [5]. Cela en fait un problème majeur qui peut être évité par des actions de prévention et qui nécessite toujours plus de recherche exploratoire.

La lithogénèse prend place dans les reins, organes dédiés à la filtration du sang, permettant de rejeter les éléments non réabsorbés *via* l'urine. Le rein est un organe pair, d'environ 150 g et mesurant 12 cm de longueur, 6 de largeur et 3 d'épaisseur environ (chez l'homme).

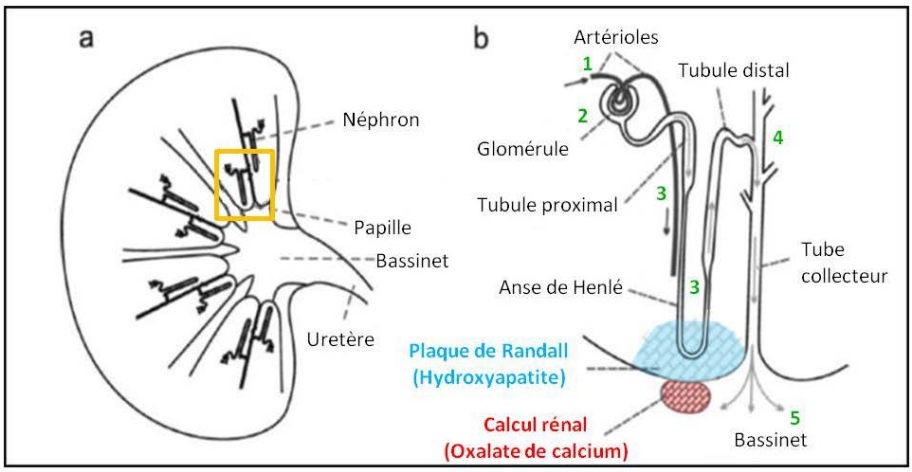



**Figure 0-1 : Schéma a) d'une coupe de rein et b) d'un néphron (modifié d'après [6]).**

La Figure 0-1 propose un schéma du système rénal humain. Les reins filtrent le sang afin de le débarrasser des déchets métaboliques. Les trois processus rénaux fondamentaux se déroulent dans le néphron (encadré en jaune sur la Figure 0-1) : la filtration glomérulaire, la réabsorption et la sécrétion. Le plasma sanguin, arrivant des artérioles (1), est filtré au niveau du glomérule, cette filtration s'effectue grâce à deux critères différents : la sélectivité de taille (grâce aux pores) et la sélectivité de charge (grâces aux polyanions)(2). Ce filtrat (urine primitive) débarrassé des protéines et lipides subit ensuite plusieurs phénomènes de réabsorptions et de sécrétions lors de son passage dans les tubules du néphron (notamment au niveau du passage dans la anse de Henlé) (3). C'est seulement dans le tubule collecteur que l'urine définitive est totalement formée (4). Cette dernière est ensuite déversée dans le grand bassinet puis dans la vessie (5). Les calculs rénaux peuvent se former dans différents endroits des reins (bassinet, tube collecteur, uretère…). *In vivo*, la formation de calculs rénaux s'effectue donc dans un environnement microscopique (tube collecteur ~ 100 µm)[7]. Mis en évidence sur la Figure 0-1, on remarque la formation d'un calcul rénal d'***oxalate de calcium hydraté*** dans le bassinet sur une plaque de Randall (PR) formée d'***hydroxyapatite***. Plusieurs pistes s'offrent à nous afin de mimer la formation de calculs rénaux : ***(i)*** l'utilisation de montages microfluidiques permettant de se rapprocher le plus possible des conditions de cristallisation et ***(ii)*** la synthèse de calculs rénaux à partir d'une plaque de Randall *i.e.* d'hydroxyapatite. Nous reviendrons sur ce point à la fin de cette Introduction.

Un calcul rénal correspond donc à une concrétion résultant de l'agglomération de cristaux associés à une matrice organique. La lithogénèse, c'est-a-dire l'ensemble des processus qui conduisent à la formation de calculs rénaux, peut être séparée en sept étapes principales [8] :

- La sursaturation des urines : ce premier processus définit les conditions initiales nécessaires pour permettre l'apparition des premiers cristaux. Dépendant du pH principalement, il correspond à la concentration des espèces ioniques susceptibles de précipiter.
- La germination cristalline : la précipitation initiale évolue lors de cette étape donnant naissance aux premières nanoparticules.
- La croissance des cristaux : cette étape correspond au grossissement des nanoparticules inorganiques d'une centaine de nanomètre à des tailles variant de 1 à 100 µm.
- L'agrégation des cristaux : rapidement les cristaux vont s'attirer et s'agréger ensemble. C'est lors de cette étape que les calculs peuvent être retenus dans les micro-canaux des reins.

- L'agglomération cristalline : du fait de la présence de macromolécules urinaires (comme la protéine de Tamm-Horsfall par exemple), d'autres cristaux vont venir s'agglomérer, participant à la croissance du calcul.
- La rétention des particules cristallisées : c'est durant cette étape que les calculs vont être bloqués dans les reins *via* quatre processus possibles : ***(i)*** l'adhésion à la surface de l'épithélium, ***(ii)*** la rétention du fait de la taille, ***(iii)*** l'accrochage direct par l'intermédiaire d'une autre phase inorganique ou de macromolécules et ***(iv)*** le blocage dans un repli ou une cavité.
- La croissance du calcul : il s'agit de la croissance du calcul directement dans le rein jusqu'à élimination par voie naturelle ou *via* une opération chirurgicale ou un traitement.

En suivant cette logique de formation, on obtient un nanocomposite, mélange complexe de phase(s) minérale(s) et de protéines ou autres molécules organiques (nous parlerons de **matrice organique** dans la suite du manuscrit). En ce qui concerne la composition de la phase minérale des calculs rénaux, elle est très dépendante du régime alimentaire et donc très différente d'un patient à l'autre. Néanmoins, il est possible de dresser un tableau des composants majoritaires de ces calculs.

**Tableau 0-1 : Fréquence des constituants majoritaires observés dans les calculs rénaux en France au cours des 10 dernières années d'après** [4].

| Constituant majoritaire | Fréquence (%) |
|---|---|
| **Oxalates de calcium** | **70,3** |
| - whewellite | 48,3 |
| - weddellite | 25,3 |
| **Phosphates de calcium** | **13,8** |
| - carbapatite | 11,4 |
| - brushite | 1,8 |
| - phosphate octocalcique | 0,3 |
| - phosphate amorphe de calcium | 0,2 |
| - whitlockite | 0,1 |
| **Struvite (PAM)** | **1,6** |
| - présence de PAM | 5,7 |
| **Purines** | **9,7** |
| - acide urique anhydre | 7,9 |
| - acide urique dihydraté | 1,5 |
| - urate d'ammonium | 0,2 |
| - autres urates | 0,1 |
| - autres purines (dihydroxyadénine, xanthine) | < 0,05 |
| - présence d'acide urique | 11,8 |
| **Cystine** | **1,0** |
| **Protéines** | **1,7** |
| **Médicaments** | **0,8** |
| **Divers** | **1,1** |

Le Tableau 0-1 met en évidence la prépondérance des oxalates de calcium hydratés ($CaC_2O_4{\cdot}nH_2O$) dans les calculs rénaux (70,3 %). Ces derniers se divisent en deux phases cristallographiques distinctes : la whewellite (oxalate de calcium monohydrate, $CaC_2O_4{\cdot}H_2O$) que nous noterons **COM** dans la suite et la weddellite (oxalate de calcium dihydrate, $CaC_2O_4{\cdot}2H_2O$), notée **COD** dans la suite. On notera qu'il est possible d'obtenir une autre phase hydratée d'oxalate de calcium : la caoxite (oxalate de calcium trihydratée, $CaC_2O_4{\cdot}3H_2O$), notée **COT** dans la suite, dans les calculs rénaux. Cette phase n'est que très peu référencée car extrêmement rare [9]. L'autre minéral d'importance est la « carbapatite ». Cette phase correspond à de l'hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) carbonatée et représente 11,4 % des constituants des calculs rénaux. Bien qu'il soit fréquent de trouver des calculs constitués exclusivement de whewellite ou de weddellite, il est extrêmement rare d'en rencontrer exclusivement formés de « carbapatite » (0,3 %). Par la suite nous parlerons d'**hydroxyapatite**

**carbonatée**. L'apatite se retrouve sous plusieurs formes dans le corps humain : en tant que fluoroapatite dans les dents, qu'hydroxyapatite substituée (par différents anions, $\mathbf{CO_3^{2-}}$, $SiO_4^{4-}$… ou cations, $\mathbf{Na^+}$, $K^+$…) dans les os : il s'agit de la phase minérale phosphatée la plus représentée [10]. C'est donc un matériau de première importance dans le corps humain, ce qui explique les nombreuses études déjà menées à son sujet. En ce qui concerne les calculs rénaux, la présence d'un noyau d'hydroxyapatite correspond à ce qui est désormais communément appelé la **plaque de Randall**, du nom de l'urologue qui l'a « découverte » en 1937 [11], au sein de certaines calcifications pathologiques, nous la noterons **PR** dans la suite (voir Figure 0-2). Cette plaque n'est autre qu'un nucleus d'hydroxyapatite (substitué par des carbonates) qui se forme dans le tissu rénal interstitiel entourant les systèmes tubulaires, notamment au niveau de la anse de Henlé (anse du néphron, voir Figure 0-1) et qui peut s'étendre dans l'urothélium [12]. Sur cette petite plaque (<< 1 mg) apatitique nucléent des calculs rénaux et principalement des calculs d'oxalates de calcium hydratés. La formation de cette plaque est indépendante de la présence de calculs rénaux mais promeut leur apparition par croissance hétérogène en tant que support de cristallisation.

**Figure 0-2 : Image d'un calcul rénal d'oxalate de calcium hydraté nucléé à partir d'une plaque de Randall, d'après** [8].

Afin d'étudier au mieux ces calcifications pathologiques, il convient donc en premier lieu de caractériser les deux familles de phases inorganiques que sont les oxalates de calcium et l'hydroxyapatite.

La matrice organique incorporée dans les calculs est plus complexe, très dépendante du régime alimentaire et du mode de vie : il est assez difficile de trouver des constantes entre différents patients. Il est néanmoins intéressant de noter que de nombreuses protéines présentes dans les urines (primitive et définitive) ont un rôle sur la nucléation et la croissance des calculs rénaux. Par exemple Qiu *et coll.* [13] ont montré que l'ostéopontine (protéine constituante de l'urine) pouvait avoir un rôle d'inhibiteur sur la cristallisation des calculs d'oxalate de calcium. Citons également la protéine de Tamm-Horsfall : cette dernière semble avoir deux rôles opposés : l'un en tant qu'inhibiteur de la croissance des calculs d'oxalate et l'autre en tant que promoteur (une fois polymérisée) de l'agglomération et la croissance de calculs rénaux d'oxalate de calcium [14], [15]. Afin de simplifier l'étude de cette partie et de comprendre l'effet de telle molécule, le citrate peut être pris comme modèle. Etant un fort chélatant du calcium présent dans les urines [16], son effet sur les oxalates de calcium est non négligeable. Pour compléter cette étude sur d'éventuels chélatants du calcium, on peut envisager d'étudier l'effet des catéchines sur les calculs rénaux d'oxalates de calcium. Cette famille de molécules, constituants majoritaires du thé vert, semble également avoir un effet sur leur formation (Figure 0-3) [17].

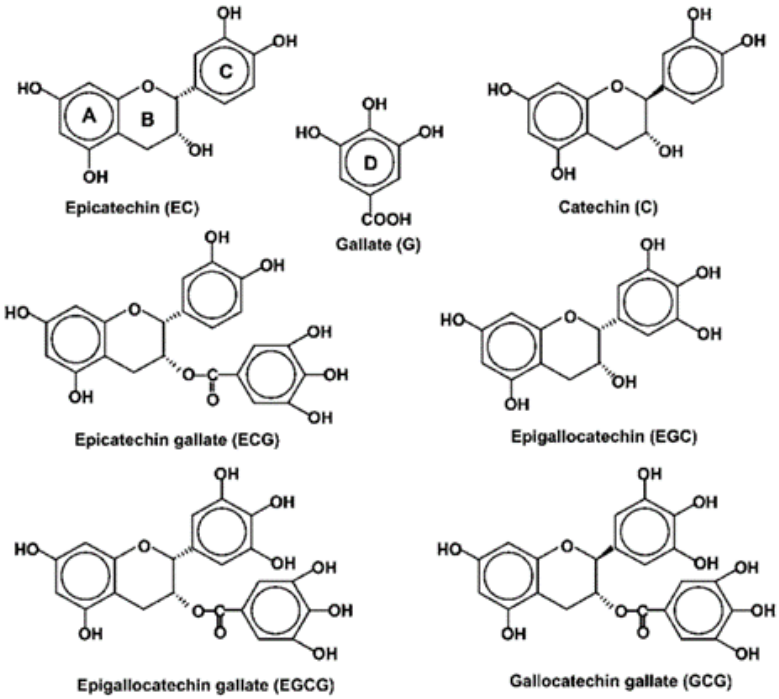



**Figure 0-3 : Structures des composants principaux du thé vert : les catéchines, d'après** [17].

Les calcifications pathologiques montrent donc une hétérogénéité structurale à différentes échelles (macro-,méso- et nanoscopiques)[18]. Des études en parallèle de ces différentes échelles permettent d'obtenir de nombreuses informations complémentaires.

Un calcul rénal récolté après expulsion par les voies naturelles ou extraction après un acte chirurgical présente des morphologies spécifiques à l'échelle macroscopique.

**Figure 0-4 : Conversion cristalline de COD à COM, d'après** [19].

Sur la Figure 0-4, on peut observer un calcul de COD (à gauche) et un calcul de COM (à droite). Il est même possible d'observer que le calcul de COM est issu d'une transformation de COD en COM. Cette étude à l'échelle macroscopique permet, en plus de d'orienter le praticien hospitalier sur la composition des calculs, de connaître leurs conditions de formation et leurs environnements [19]. Suivant les conditions de cristallisation, l'aspect et la composition des cristaux sont différents : cela se vérifie par exemple par des synthèses *in vitro*. D'un point de vue mésoscopique, l'utilisation d'un microscope électronique à balayage (MEB) permet de caractériser la morphologie des cristallites formés et leur état d'agrégation (mésocristaux). Par exemple, en hypercalciurie (c'est-à-dire en excès

d'ions calcium dans les urines), la morphologie obtenue est typique de la phase dihydratée d'oxalate de calcium (COD), alors qu'en hyperoxalurie (excès d'ions oxalates dans les urines) les cristaux obtenus sont principalement des oxalates de calcium monohydratés (COM) [20]. Afin d'avoir une approche plus complète de ces échantillons, il est nécessaire d'aborder l'échelle nanoscopique. Pour se faire, l'étude par diffraction des rayons X (et des neutrons) permet une analyse structurale permettant de déterminer précisément la composition chimique. La quantification et la taille des nanocristallites composant les calculs rénaux sont alors accessibles [21], [22]. Les techniques de diffraction offrent également la possibilité d'étudier les substitutions dans les phases minérales ce qui, dans notre cas, peut être très intéressant en ce qui concerne la plaque de Randall (rappelons ici qu'il s'agit d'une hydroxyapatite carbonatée) [23]. De nombreuses autres techniques moins usuelles peuvent être mises en œuvre pour caractériser les calculs rénaux. Par exemple, le XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*) peut être utilisé pour évaluer l'environnement local des atomes de calcium [24]. On peut également citer les travaux effectués à l'aide de la XRF (*X-ray Fluorescence*) (technique spectroscopique permettant de sonder la structure électronique des atomes afin de déterminer la composition élémentaire des calcifications pathologiques) [25]. Bien que toutes ces techniques sophistiquées apportent de nombreuses informations (environnements locaux, composition chimique, quantification, architecture des nanocomposites organiques-inorganiques, *etc.*), le médecin doit avoir à sa disposition des méthodes d'analyse informatives et simples à mettre en œuvre en milieu hospitalier.

C'est pourquoi les praticiens hospitaliers ont choisi une méthode rapide pour analyser les calculs rénaux, il s'agit de la spectroscopie infrarouge (IR) [26]. Cette technique vibrationnelle est rapide et permet facilement de caractériser les différentes liaisons chimiques, conduisant en pratique à la détermination des phases majoritaires composant un calcul donné. En revanche, elle ne permet pas de distinguer aisément les différentes phases d'un mélange et de donner des informations non-ambigües sur la matrice organique (protéines, triglycérides, *etc.*). Les protéines vont, par exemple, contribuer à des bandes de vibrations entre 1600 et 1000 $cm^{-1}$, une gamme de longueur d'onde qui se recouvre avec les signatures de l'élongation antisymétrique caractéristique des anions phosphates ($\nu_{a(PO_4^{3-})}$) de l'hydroxyapatite (1090-1015 $cm^{-1}$). Si l'on considère un calcul rénal contenant des protéines, des triglycérides, une phase majoritaire d'oxalate de calcium hydraté (COM, par exemple), une phase minoritaire (COD, par exemple), une plaque de Randall…, il devient de plus en plus difficile d'analyser celui-ci par cette unique méthode d'analyse. Afin de gagner en résolution spatiale, certains calculs ont pu être analysés à l'aide du rayonnement synchrotron [23]. Les résultats obtenus sont extrêmement intéressants : temps d'acquisition réduits, sensibilité accrue, cartographies plus résolues… Néanmoins il n'est pas envisageable d'analyser chaque calcul rénal par cette approche qui s'avère être techniquement lourde. Il est donc nécessaire de s'orienter vers une technique d'analyse tout à la fois accessible et la plus résolutive possible.

La technique choisie ici pour analyser les nanocomposites naturels présentés ci-dessus au cours de cette thèse est la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en phase solide. En plus d'apporter des informations sur la composition des échantillons, il est possible d'estimer l'ordre/désordre dans les échantillons. Curieusement, il existe relativement peu d'articles consacrés à l'étude des calculs rénaux d'oxalates de calcium. On peut néanmoins citer les travaux de Bak *et coll.* [27], ainsi que de Reid *et coll.* qui par l'utilisation d'une séquence d'impulsions spécifique (REDOR, *Rotational-Echo, Double Resonance*) ont pu obtenir des informations précieuses sur *l'interface* entre protéines et

cristaux d'apatite d'un calcul [28]. Cette technique a également été utilisée, par Duer *et coll.* pour analyser des dents [29], la structure atomique et moléculaire des os [30] et d'autres calcifications pathologiques [31], [32]. Au cours de cette thèse, nous avons mis en place une méthodologie d'analyse par RMN MAS « standard » et DNP MAS (*Dynamic Nuclear Polarization*). Par RMN « standard », nous entendons des expériences effectuées à haut (ultra haut) champs magnétiques (de 700 à 850 MHz), en rotation MAS élevée (jusqu'à 40 kHz) ou ultra fast MAS (de 65 à 85 kHz). Une approche multinucléaire ($^{1}$H, $^{13}$C, $^{31}$P, $^{43}$Ca) et multidimensionnelle a été systématiquement mise en place. Une telle approche fait appel à l'ensemble des interactions RMN (déplacement chimique, couplages dipolaires homo- et hétéronucléaire, couplage J à travers les liaisons) qui sont autant d'espions structuraux. Nous montrerons en particulier que le contenu global des calculs rénaux en phases minérales (oxalates de calcium, hydroxyapatite, autres phosphates peu décrits dans la littérature…) et phase organique (matrice organique incluant des protéines, des acides gras, des triglycérides…) peut être appréhendé par l'utilisation des méthodes d'*édition spectrale*.

Sachant que la diversité des calcifications pathologiques est immense (étant patient-dépendantes), nous avons consacré une large part de notre travail de thèse à la synthèse des phases minérales (oxalates de calcium hydratés et hydroxyapatite), en mettant plusieurs protocoles en place. Certains de ces protocoles nous permettront de nous rapprocher en un sens des conditions de cristallisation *in vivo* (synthèse en gel, utilisation de canaux microfluidiques). A partir de ces phases synthétiques, nous démontrerons que l'**ordre/désordre** local est bien mis en évidence par RMN en phase solide alors que la DRX sur poudre et la spectroscopie FTIR ne conduisent qu'à des informations partielles. Nous montrerons également, qu'à l'heure actuelle, la RMN $^{43}$Ca MAS en *abondance naturelle* devient un outil analytique pertinent.

La plaque de Randall, évoquée précédemment, nous a conduit à reconsidérer le problème majeur de la RMN à savoir la *sensibilité* ! Une PR unique est caractérisée par une masse << 1 mg, ce qui compromet bien évidemment la réussite des expériences de RMN. Nous démontrerons que l'approche DNP MAS permet de véritables avancées dans la caractérisation de tels (petits) objets biologiques. En particulier, nous montrerons que la DNP peut « révolutionner » l'enregistrement de spectre 1D **et** 2D $^{43}$Ca MAS en *abondance naturelle* (0,14 %). Les expériences DNP ont été, une fois encore, optimisées à l'aide de composés synthétiques : nanoparticules d'hydroxyapatite substituées en ions carbonates et sodium, différentes phases d'oxalates de calcium présentant divers taux d'hydratation (COM, COD et COT). Dans un second temps, la méthodologie RMN DNP MAS ainsi établie sera étendue à l'étude de plusieurs calcifications pathologiques (calculs rénaux d'origines multiples et plaque de Randall).

Le **Chapitre 1** présente l'ensemble des composés synthétiques étudiés au cours de la thèse, qui nous serviront à fonder l'approche RMN/DNP sur des bases solides : processus synthétiques, caractérisations par FTIR, DRX sur poudre, analyses thermiques et microscopie électronique en transmission (MET) et à balayage (MEB).

Le **Chapitre 2** est une présentation succincte des concepts RMN et DNP qui ont été nécessaires à la mise en place des expériences.

Le **Chapitre 3** est central dans notre travail. Les phosphates et oxalates de calcium synthétiques sont étudiés systématiquement par RMN « standard » à température ambiante et par DNP MAS à T ~ 100 K. Nous porterons une attention particulière au protocole DNP mis en place, sachant que la préparation de l'échantillon constitue un paramètre clef (et parfois limitant) de

l'expérience. Un article en préparation, décrivant les premières expériences de $^{1}H \rightarrow {}^{43}Ca$ DNP HETCOR CP MAS, est présenté à la fin du Chapitre 3.

Le **Chapitre 4** est irrigué par les résultats obtenus dans le Chapitre 3. Le but est ici de se confronter à des objets biologiques présentant de fait une variabilité intrinsèque de composition et d'architecture. Ce Chapitre correspond évidemment aux expériences les plus risquées, tant au niveau de leur mise en place que de leur interprétation.

Le **Chapitre 5** présente de nouvelles approches synthétiques mêlant intimement phases minérales et composantes organiques. Nous présenterons également des résultats originaux mettant en œuvre des montages microfluidiques mimant les tubules d'un néphron (voir Figure 0-1). Ces expériences ont donné lieu à un autre article d'ores et déjà publié (*Calcium oxalate precipitation by diffusion using laminar microfluidics: toward a biomimetic model of pathological microcalcifications*, Lab on a Chip, vol.16, 7, **2016**) et pourront être généralisées dans un futur proche.

Mots-clefs : hydroxyapatite substituées – oxalates de calcium hydratés – calculs rénaux – plaque de Randall – hybrides organiques-inorganiques – RMN en phase solide – DNP CP MAS $^{1}H$, $^{13}C$, $^{23}Na$, $^{43}Ca$ (1D et 2D).

## Bibliographie Introduction :


[1] M. Daudon, O. Traxer, and P. Jungers, *Lithiase Urinaire*, 2e édition. **2012**.

[2] G. Androutsos, "La Maladie Urogénitale de Napoléon III (1808-1873)," *Progrès en Urol.*, 10, 142–152, **2000**.

[3] M. Montaigne, "Essais," in *Livre III, Chapitre IV*, **1595**, 1308.

[4] M. Daudon, "Épidémiologie Actuelle de la Lithiase Rénale en France," *Ann. Urol. (Paris).*, 39, 6, 209–231, **2005**.

[5] C. Saussine, E. Lechevallier, and O. Traxer, "Aspects Médicoéconomiques de la Lithiase Urinaire," *Prog. en Urol.*, 18, 12, 875–877, **2008**.

[6] I. Sethmann, B. Grohe, and H.-J. Kleebe, "Replacement of Hydroxylapatite by Whewellite: Implications for Kidney-Stone Formation," *Mineral. Mag.*, 78, 1, 91–100, **2014**.

[7] P. D. Vize, A. S. Woolf, and J. B. L. Bard, *The Kidney : from Normal Development to Congenital Abnormalities*, Elsevier S. Amsterdam, **2003**.

[8] M. Daudon, O. Traxer, E. Lechevallier, and C. Saussine, "La Lithogenèse," *Progrès en Urol.*, 18, 12, 815–827, **2008**.

[9] R. C. Walton, J. P. Kavanagh, B. R. Heywood, and P. N. Rao, "Calcium Oxalates Grown in Human Urine Under Different Batch Conditions," *J. Cryst. Growth*, 284, 3–4, 517–529, **2005**.

[10] L. C. Palmer, C. J. Newcomb, S. R. Kaltz, E. D. Spoerke, and S. I. Stupp, "Biomimetic Systems for Hydroxyapatite Mineralization Inspired By Bone and Enamel," *Chem. Rev.*, 108, 11, 4754–4783, **2008**.

[11] A. Randall, "The Origin and Growth of Renal Calculi," *Ann. Surg.*, 105, 6, 1009–1027, **1937**.

[12] A. P. Evan, J. E. Lingeman, F. L. Coe, J. H. Parks, S. B. Bledsoe, Y. Shao, A. J. Sommer, R. F. Paterson, R. L. Kuo, and M. Grynpas, "Randall's Plaque of Patients with Nephrolithiasis Begins in Basement Membranes of Thin Loops of Henle," *J. Clin. Invest.*, 111, 5, 607–616, **2003**.

[13] S. R. Qiu, A. Wierzbicki, C. a Orme, a M. Cody, J. R. Hoyer, G. H. Nancollas, S. Zepeda, and J. J. De Yoreo, "Molecular Modulation of Calcium Oxalate Crystallization by Osteopontin and Citrate," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 7, 1811–5, **2004**.

[14] B. Hess, S. Jordi, L. Zipperle, E. Ettinger, and R. Giovanoli, "Citrate Determines Calcium Oxalate Crystallization Kinetics and Crystal Morphology-Studies in the Presence of Tamm-Horsfall Protein of a Healthy Subject and a Severely Recurrent Calcium Stone Former," *Nephrol. Dial. Transplant*, 15, 3, 366–374, **2000**.

[15] H. G. Tiselius, "A Hypothesis of Calcium Stone Formation: An Interpretation of Stone Research During the Past Decades," *Urol. Res.*, 39, 4, 231–243, **2011**.

[16] H. Bek-Jensen, A. M. Fornander, M. a Nilsson, and H. G. Tiselius, "Is Citrate an Inhibitor of Calcium Oxalate Crystal Growth in High Concentrations of Urine?," *Urol. Res.*, 24, 2, 67–71, **1996**.

[17] Z. Chen, C. Wang, H. Zhou, L. Sang, and X. Li, "Modulation of Calcium Oxalate Crystallization by Commonly Consumed Green Tea," *CrystEngComm*, 12, 3, 845, **2010**.

[18] D. Bazin and M. Daudon, “Nouvelles Méthodes d’Etudes des Calculs et des Plaques de Randall,” *Les Actual. Néphrologiques*, **2010**.

[19] M. Daudon, P. Jungers, D. Bazin, J. C. Williams, A. P. Evan, J. E. Lingeman, and J. a. McAteer, “Stone Morphology: Implication for Pathogenesis,” *AIP Conf. Proc.*, 1049, 199–215, **2008**.

[20] M. Daudon, P. Jungers, D. Bazin, and P. Jungers, “Peculiar Morphology of Stones in Primary Hyperoxaluria,” *N. Engl. J. Med.*, 359, 1, 100–2, **2008**.

[21] M. T. D. Orlando, L. Kuplich, D. O. de Souza, H. Belich, J. B. Depianti, C. G. P. Orlando, E. F. Medeiros, P. C. M. da Cruz, L. G. Martinez, H. P. S. Corrêa, and R. Ortiz, “Study of Calcium Oxalate Monohydrate of Kidney Stones by X-Ray Diffraction,” *Powder Diffr.*, 23, S1, 59–64, **2012**.

[22] V. Uvarov, I. Popov, N. Shapur, T. Abdin, O. N. Gofrit, D. Pode, and M. Duvdevani, “X-Ray Diffraction and SEM Study of Kidney Stones in Israel: Quantitative Analysis, Crystallite Size Determination, and Statistical Characterization,” *Environ. Geochem. Health*, 33, 6, 613–622, **2011**.

[23] D. Bazin, M. Daudon, C. Combes, and C. Rey, “Characterization and Some Physicochemical Aspects of Pathological Microcalcifications,” *Chem. Rev.*, 112, 10, 5092–5120, **2012**.

[24] D. Bazin, X. Carpentier, I. Brocheriou, P. Dorfmuller, S. Aubert, C. Chappard, D. Thiaudière, S. Reguer, G. Waychunas, and P. Jungers, “Revisiting the Localisation of $Zn^{2+}$ Cations Sorbed on Pathological Apatite Calcifications Made Through X-Ray Absorption Spectroscopy,” *Biochimie*, 91, 10, 1294–1300, **2009**.

[25] N. A. Pal’chik, T. N. Moroz, N. V Maksimova, and A. V Dar’in, “Mineral and Microelement Compositions of Urinary Stones,” *Russ. J. Inorg. Chem.*, 51, 7, 1098–1105, **2006**.

[26] M. Daudon and P. Jungers, “Clinical Value of Crystalluria and Quantitative Morphoconstitutional Analysis of Urinary Calculi,” *Nephron Physiol.*, 98, 2, p31–p36, **2004**.

[27] M. Bak, J. K. Thomsen, H. J. Jakobsen, S. E. Petersen, T. E. Petersen, and N. C. Nielsen, “Solid-State $^{13}C$ and $^{31}P$ NMR Analysis of Urinary Stones,” 164, September, 856–863, **2000**.

[28] D. G. Reid, G. J. Jackson, M. J. Duer, and A. L. Rodgers, “Apatite in Kidney Stones is a Molecular Composite with Glycosaminoglycans and Proteins: Evidence from Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, and Relevance to Randall’s Plaque, Pathogenesis and Prophylaxis,” *J. Urol.*, 185, 2, 725–30, **2011**.

[29] D. Laurencin, A. Wong, W. Chrzanowski, J. C. Knowles, D. Qiu, D. M. Pickup, R. J. Newport, Z. Gan, M. J. Duer, and M. E. Smith, “Probing the Calcium and Sodium Local Environment in Bones and Teeth using Multinuclear Solid State NMR and X-ray Absorption Spectroscopy,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12, 5, 1081–1091, **2010**.

[30] M. J. Duer, “The Contribution of Solid-State NMR Spectroscopy to Understanding Biomineralization : Atomic and Molecular Structure of Bone,” *J. Magn. Reson.*, 253, 98–110, **2015**.

[31] D. G. Reid, M. J. Duer, G. E. Jackson, R. C. Murray, A. L. Rodgers, and C. M. Shanahan, “Citrate Occurs Widely in Healthy and Pathological Apatitic Biomineral: Mineralized Articular Cartilage, and Intimal Atherosclerotic Plaque and Apatitic Kidney Stones,” *Calcif. Tissue Int.*, 93, 3, 253–260, **2013**.

[32] M. J. Duer, T. Friscic, D. Proudfoot, D. G. Reid, M. Schoppet, C. M. Shanahan, J. N. Skepper, and E. R. Wise, “Mineral Surface in Calcified Plaque Is Like That of Bone: Further Evidence for Regulated Mineralization,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 28, 11, 2030–2034, **2008**.

# Chapitre 1 : Synthèses et caractérisations des matériaux d'intérêt : oxalates et phosphates de calcium

**1. Les oxalates de calcium, $CaC_2O_4 \cdot nH_2O$ ..... 21**
a) Les différentes phases d'oxalates de calcium hydratés ..... 22
i. Oxalate de calcium monohydraté (COM) : whewellite ..... 22
ii. Oxalate de calcium dihydraté (COD) : weddellite ..... 24
iii. Oxalate de calcium trihydraté (COT) : caoxite ..... 25
iv. Oxalate de calcium amorphe (ACO) : ..... 26
v. Oxalate de calcium anhydre (COAnh) : ..... 27
b) Produits thermodynamiques et cinétiques ..... 28
c) Synthèses mises en œuvre ..... 29
i. Les trois hydrates d'oxalate de calcium ..... 29
ii. L'oxalate de calcium anhydre, COAnh ..... 31
iii. La phase amorphe d'oxalate de calcium, ACO ..... 32
d) Méthodes de caractérisation ..... 32
i. Spectroscopie infrarouge (FTIR) ..... 33
ii. Spectroscopie Raman ..... 37
iii. Diffraction des rayons X (DRX) ..... 39
iv. Analyse thermique différentielle et thermogravimétrique (ATD/TG) ..... 39
v. Microscopie électronique à balayage (MEB) ..... 43

**2. Apatite et apatites substituées ..... 48**
a) Structures hexagonale et monoclinique ..... 48
b) Substitutions et rôle des carbonates ..... 51
c) Synthèses mises en œuvre ..... 52
i. Précipitation par goutte à goutte ..... 52
ii. Synthèse en autoclave ..... 53
d) Méthodes de caractérisation ..... 53
i. FTIR, une sonde à carbonates ..... 53
ii. La Diffraction des rayons X (DRX) ..... 55
iii. Microscopies électronique en transmission (MET) et à balayage (MEB) ..... 56

# Chapitre 1: Synthèses et caractérisations des matériaux d'intérêt : oxalates et phosphates de calcium

Dans ce chapitre, nous allons aborder la synthèse des différents composés étudiés au cours de notre travail de thèse ainsi que leur caractérisation par des techniques classiques (FTIR, DRX sur poudre…).

- La première partie sera consacrée à l'étude des oxalates de calcium, matériaux au cœur de ce travail. Leurs synthèses ont été optimisées en ajustant différents paramètres lors d'une précipitation par goutte à goutte. Nous avons également essayé de modifier leurs morphologies par des synthèses dans différents gels. Les poudres microcristallines et cristaux obtenus ont été analysés par spectroscopie infrarouge (FTIR), diffusion Raman, diffraction des rayons X (DRX) et microscopie électronique à balayage (MEB).
- La seconde partie, plus courte, sera centrée sur l'hydroxyapatite. Les synthèses par précipitation (goutte à goutte) ainsi qu'en autoclave ont également été perfectionnées de façon à obtenir des tailles de cristaux définies. De la même manière que pour les oxalates de calcium, ces composés ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge et diffraction des rayons X.

## 1. Les oxalates de calcium, $CaC_2O_4 \cdot nH_2O$

Les oxalates de calcium, de formule $CaC_2O_4 \cdot nH_2O$ avec n = 0, 1, 2, 3, sont largement décrits comme étant les principales composantes inorganiques des calcifications pathologiques. Dans le corps humain, ces phases cristallines sont issues de la précipitation des ions oxalates avec des cations $Ca^{2+}$ du fait notamment de la sursaturation de ces espèces ioniques ou d'un changement « brutal » de pH. Celle-ci se déroule presque exclusivement au niveau des reins, majoritairement dans les tubules collecteurs et le bassinet et donne naissance à ce que nous appelons couramment les calculs rénaux [1].

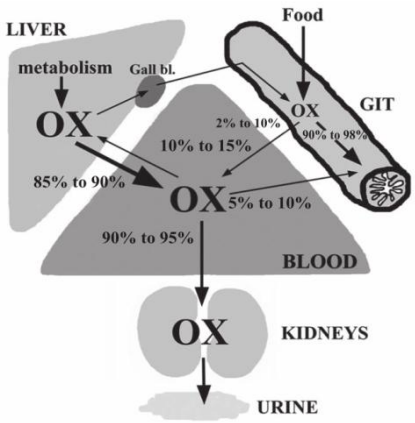



**Figure 1-1 : Chemins de transport des oxalates chez les mammifères** [2].

La Figure 1-1 montre la provenance et le transport des oxalates dans le corps d'un mammifère. Dans des conditions physiologiques, les oxalates sont partiellement absorbés à partir des aliments tels que

le cacao, le thé, les épinards, les baies, *etc.* (oxalates exogènes) dans le système gastro-intestinal (GIT), et en grande partie produits *via* le métabolisme hépatique (oxalates endogènes). Les oxalates exogènes représentent une faible partie (de 10 à 15 %) de la quantité totale présente dans le corps, la majorité d'entre eux étant éliminée par les bactéries intestinales en tant que source d'énergie ou dans les fèces. Les oxalates produits directement dans le corps sont, quant à eux, partiellement éliminés par le foie mais restent prédominants (90 à 95 %) par rapport aux oxalates exogènes. Les reins restent les organes privilégiés permettant d'éliminer les oxalates de l'organisme ; environ 90 % sont filtrés dans ces derniers alors que le reste est traité par l'intestin.

Le calcium est quant à lui un élément extrêmement présent dans le corps humain : le tissu osseux en contient près de 99%, tandis que 1% restant se situe dans les espaces intra- et extracellulaires. Environ 50% du calcium sérique est sous forme ionisé libre, tandis que 10 % sont liés à des bicarbonates, des citrates, des lactates et des phosphates. Les 40 % restants sont liés à des protéines plasmatiques (comme l'albumine). Contrairement aux oxalates, les aliments représentent la seule source de calcium pour l'organisme [2].
Chez l'homme, la quantité quotidienne de calcium filtrée par les glomérules rénaux est d'environ 10 grammes, tandis que la quantité excrétée *via* l'urine en 24 heures varie entre 100 et 300 mg. Cela signifie que 98-99 % du calcium filtré par le rein est réabsorbé dans l'organisme [2].
Le lien entre l'augmentation de l'excrétion urinaire du calcium et la néphrolithiase a été décrit pour la première fois dans les années trente. En effet, environ 50 % des patients affectés par des lithiases urinaires souffrent également d'hypercalciurie (4 mg/kg), par rapport à 2-5 % de la population en bonne santé.

La cristallurie (c'est-à-dire la présence de cristaux dans les urines) est caractérisée par un phénomène de sursaturation dans les reins. Cette dernière est donc défini par la quantité d'oxalate de calcium dissous dans l'urine primitive (avant réabsorption par les reins) et/ou l'urine [3].

### a) Les différentes phases d'oxalates de calcium hydratés

Comme expliqué ci-dessus, les oxalates de calcium représentent la phase minérale majoritaire des calculs rénaux : ils peuvent exister sous plusieurs formes cristallines. Les deux phases prépondérantes rencontrées dans la lithiase urinaire sont la phase monohydratée $CaC_2O_4{\cdot}H_2O$ (appelée COM par la suite) et la phase dihydratée $CaC_2O_4{\cdot}2H_2O$ (COD). Une troisième phase cristalline peut être rencontrée, $CaC_2O_4{\cdot}3H_2O$, appelée COT, mais elle est largement minoritaire au sein des calculs. Il existe d'autres phases d'oxalate de calcium, notamment la forme amorphe (notée ACO) qui suscite beaucoup d'intérêt dans le domaine biomédical de par sa probable apparition avant la cristallisation de COM/COD [4]. La forme anhydre, $CaC_2O_4$ (notée COAnh) est, quant à elle, beaucoup moins étudiée.

#### *i. Oxalate de calcium monohydraté (COM) : whewellite*

Son nom étant relié à William Whewell, un scientifique britannique, la whewellite est l'oxalate le plus présent dans les calcifications pathologiques (environ 2/3 des oxalates de calcium [5]) : il est de ce fait le plus étudié actuellement. De formule chimique $CaC_2O_4{\cdot}H_2O$, il cristallise dans le système cristallin monoclinique et a pour groupe d'espace le $\mathbf{P2_1/c}$ (Figure 1-2). Issue de calculs rénaux, de plantes ou de sédiments, la whewellite a suscité un intérêt scientifique dès sa découverte : ce n'est qu'un peu plus tard que les travaux réalisés ont été utilisés à des fins de diagnostic médical. En 1965

Arnott *et coll.* [6] proposent une structure fondée sur la diffraction des rayon X. Malgré un échantillon présentant des impuretés, les auteurs ont pu identifier la phase COM à partir d'un extrait de plante. Ils ont ensuite pu comparer leurs résultats avec ceux antérieurs de Pecora *et coll.* [7] effectués sur une concrétion septarienne de calcaire. Plus récemment, plusieurs travaux intéressants ont permis d'affiner la structure de COM : on peut citer les articles de Tazzoli *et coll.* [8], Hochrein *et coll.* [9] et Deganello *et coll.* [10], [11]. Ces derniers ont établi des structures de COM à différentes températures et montrent qu'il peut y avoir un changement réversible de groupe d'espace de **$P2_1/c$** à **I2/m** vers 328 K.

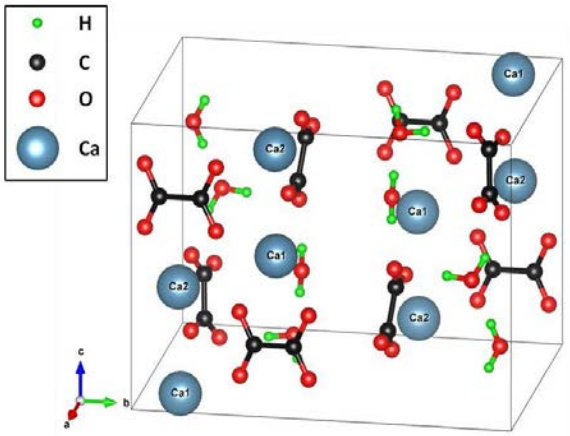



Figure 1-2 : Représentation de la structure cristalline de la whewellite (COM), $CaC_2O_4{\cdot}H_2O$ d'après [12].

La synthèse de ce composé est aisée car il est le plus stable thermodynamiquement (voir paragraphe 1. b)).

Tableau 1-1 : Paramètres de maille et coordonnées atomiques de la whewellite, $CaC_2O_4{\cdot}H_2O$ (COM) d'après [12]

| Paramètres de maille | β (°) | a (Å) | b (Å) | c (Å) |
|---|---|---|---|---|
| **Expérimentaux** | 109,978 | 6,250 | 14,471 | 10,114 |
| **Atome** | **Occ.** | **x** | **y** | **z** |
| **C(1)** | 1 | 0,97700 | 0,32008 | 0,24390 |
| **C(2)** | 1 | 0,99830 | 0,42690 | 0,25050 |
| **C(3)** | 1 | 0,51470 | 0,12697 | 0,18040 |
| **C(4)** | 1 | 0,44260 | 0,11592 | 0,31320 |
| **Ca(1)** | 1 | 0,96197 | 0,12372 | 0,05344 |
| **Ca(2)** | 1 | 0,99212 | 0,12283 | 0,43515 |
| **O(1)** | 1 | 0,96650 | 0,28174 | 0,13030 |
| **O(2)** | 1 | 0,98980 | 0,46552 | 0,13750 |
| **O(3)** | 1 | 0,97070 | 0,28100 | 0,35370 |
| **O(4)** | 1 | 0,98980 | 0,46559 | 0,36000 |
| **O(5)** | 1 | 0,35730 | 0,14503 | 0,06840 |
| **O(6)** | 1 | 0,73780 | 0,12132 | 0,20510 |
| **O(7)** | 1 | 0,27930 | 0,12102 | 0,30310 |
| **O(8)** | 1 | 0,60250 | 0,10490 | 0,42690 |
| **$O_w(1)$** | 1 | 0,38730 | 0,34435 | 0,10090 |
| **$O_w(2)$** | 1 | 0,58500 | 0,39260 | 0,38900 |
| **H(11)** | 1 | 0,47900 | 0,36700 | 0,04900 |
| **H(12)** | 1 | 0,38800 | 0,27920 | 0,09100 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **H(21)** | 1 | 0,47300 | 0,37800 | 0,43100 |
| **H(22)** | 1 | 0,51300 | 0,37800 | 0,29100 |

Cette structure possède quatre atomes ou carbones inéquivalents par maille ainsi que deux atomes de calcium et quatre atomes d'hydrogène. Ces données seront reprises lors de l'étude par RMN proposée dans la suite de cette thèse (Tableau 1-1).

### *ii. Oxalate de calcium dihydraté (COD) : weddellite*

Le COD, $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$, peut facilement être rencontré dans des calculs rénaux mais également sous forme de sédiments au fond de la mer de Weddell en Antarctique (d'où son nom de weddellite). Il a la particularité de présenter une structure zéolithique (Figure 1-3) : le nombre de molécules d'eau dans cette structure est donc variable comme nous le verrons par la suite. Il convient donc d'écrire sa formule ainsi : $CaC_2O_4 \cdot (2+x)H_2O$ avec $x < 1$. En réalité, le nombre de molécules d'eau au sein de cette structure est encore sujet à discussion. Sterling propose dès 1964 une structure pour cette phase [13] en soulevant clairement le problème de la définition du nombre de molécules d'eau. Il a défini le système cristallin de la weddellite comme étant tétragonal avec le groupe d'espace **I4/m.**

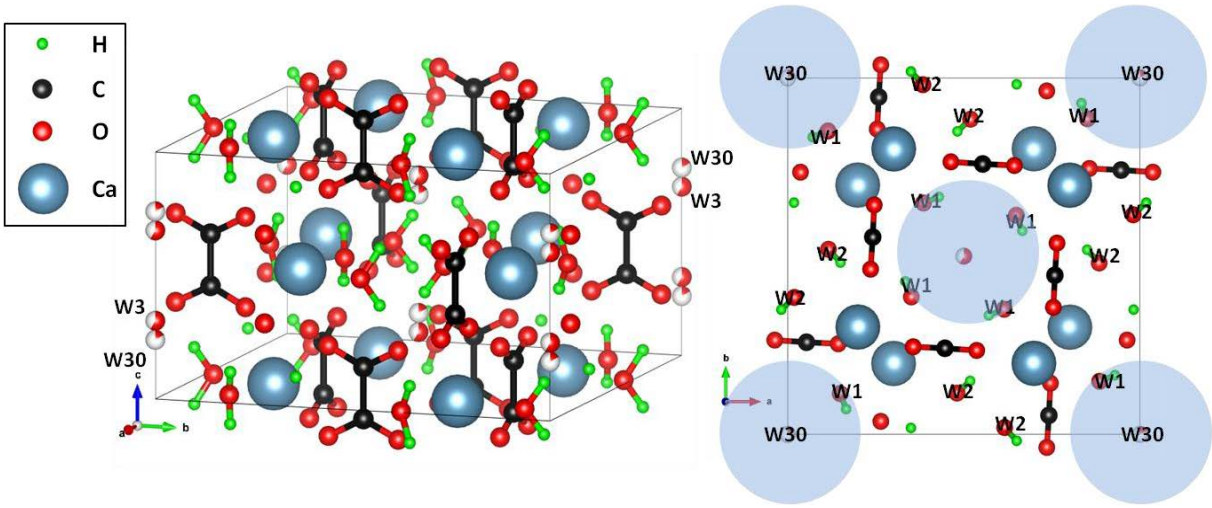



**Figure 1-3 : Représentation de la structure cristalline de la weddellite $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$ (COD) mettant en évidence les canaux zéolithiques d'après** [8].

La représentation de la structure cristalline de COD (Figure 1-3) correspond aux paramètres du Tableau 1-2. Les canaux zéolithiques contenant les molécules d'eau sont clairement visibles. Il s'agit d'une phase *métastable* qui se transforme sous forme de COM s'il n'est pas conservé sous certaines conditions : Conti *et coll.* ont d'ailleurs suivi cette transformation par diffraction des rayons X et IR [14] (voir ci-dessous). Les canaux zéolithiques sont mis en évidence dans la structure de la weddellite (Figure 1-3).

Tableau 1-2 : Paramètres de maille et coordonnées atomiques de la weddellite $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$ (COD) d'après [8].

| Paramètres de maille | | a (Å) | b (Å) | c (Å) |
|---|---|---|---|---|
| **Expérimentaux** | | 12,371 | 12,371 | 7,357 |
| **Atome** | **Occ.** | **x** | **y** | **z** |
| **C** | 1 | 0,4464 | 0,2415 | 0,1053 |
| **Ca** | 1 | 0,1993 | 0,3011 | 0,0000 |
| **O(1)** | 1 | 0,3564 | 0,2458 | 0,1829 |
| **O(2)** | 1 | 0,2355 | 0,4634 | 0,1799 |
| **$O_w$(1)** | 1 | 0,1490 | 0,1145 | 0,0000 |
| **$O_w$(2)** | 1 | 0,0192 | 0,3841 | 0,0000 |
| **$O_w$(3)** | 0,58 | 0,0000 | 0,0000 | 0,6830 |
| **$O_w$(30)** | 0,17 | 0,0000 | 0,0000 | 0,2400 |
| **H(1)** | 1 | 0,1660 | 0,0710 | 0,1050 |
| **H(2)** | 1 | 0,3500 | 0,0180 | 0,1150 |

Les molécules d'eau zéolithiques sont représentées par W(3) et W(30) sur la Figure 1-3. Ces positions très proches ne représentent qu'une molécule d'eau avec une occupation incomplète dans le canal zéolithique [8], [13]. Ce que l'on peut retenir de cette structure est la présence d'un seul site de carbone, ainsi qu'un seul site de calcium. Il existe un désordre en ce qui concerne les molécules d'eau à l'intérieur des canaux zéolithiques.

### *iii. Oxalate de calcium trihydraté (COT) : caoxite*

C'est la phase la moins présente dans les calculs rénaux, de formule chimique $CaC_2O_4 \cdot 3H_2O$. Elle présente une structure triclinique et $\mathbf{P\bar{1}}$ comme groupe d'espace. Reconnue seulement en 1996 comme minéral, son nom est un acronyme pour ***CA****lcium* ***OX****alate* et ***C****entennial* ***A****nniversary* ***o****f* ***X****-rays* et a été proposé lors de cet événement pour le centenaire de la diffraction des rayons X [15], [16].

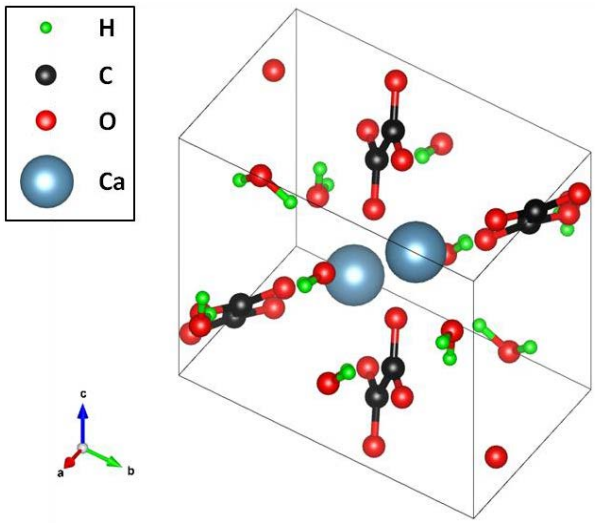



Figure 1-4 : Représentation de la structure cristalline de la caoxite (COT) [17].

Deganello *et coll.* [17] et Echigo *et coll.* [12] ont été les premiers à proposer une structure pour le COT. Cette phase a été proposée à l'origine comme un intermédiaire dans la formation du COM et du COD au sein les calcifications pathologiques [18], [19]. Cette hypothèse a depuis lors été

abandonnée au profit de celle de la phase amorphe d'oxalate de calcium comme précurseur des deux hydrates (COM et COD). Bien que moins intéressante pour le diagnostic médical, elle reste néanmoins souvent présente dans les synthèses *in vitro* sous forme de produits secondaires. Sa formation peut être évitée par l'utilisation de montages microfluidiques (voir Chapitre 5).

**Tableau 1-3 : Paramètres de maille et coordonnées atomiques de la caoxite $CaC_2O_4 \cdot 3H_2O$ (COT) d'après** [17].

| Paramètres de maille | α (°) | β (°) | γ (°) | a (Å) | b (Å) | c (Å) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Expérimentaux** | 112,300 | 108,870 | 89,920 | 7,145 | 8,600 | 6,099 |
| **Atome** | | | | **x** | **y** | **z** |
| **C(1)** | | | | -0,40150 | 0,05010 | 0,10820 |
| **C(2)** | | | | 0,42850 | 0,44390 | -0,13310 |
| **Ca** | | | | 0,28100 | 0,30790 | 0,21610 |
| **O(1)** | | | | -0,41130 | 0,19360 | 0,26120 |
| **O(2)** | | | | 0,24790 | 0,02250 | -0,11090 |
| **O(3)** | | | | 0,28460 | 0,35580 | -0,14210 |
| **O(4)** | | | | 0,46430 | 0,44840 | -0,31980 |
| **$O_w$(1)** | | | | 0,13700 | 0,12750 | 0,36080 |
| **$O_w$(2)** | | | | 0,12400 | -0,44390 | 0,36880 |
| **$O_w$(3)** | | | | 0,08150 | -0,24520 | 0,05500 |
| **H(1)** | | | | 0,01400 | 0,43400 | 0,64600 |
| **H(2)** | | | | 0,80300 | 0,34500 | 0,48700 |
| **H(3)** | | | | 0,86500 | 0,32500 | 0,85300 |
| **H(4)** | | | | 0,98900 | 0,10100 | 0,31300 |
| **H(5)** | | | | 0,21100 | 0,16500 | 0,54000 |
| **H(6)** | | | | 0,82300 | 0,13600 | 0,80800 |

Il y a dans cette structure deux sites inéquivalents pour le carbone et un seul en calcium. Les molécules d'eau ont des positions bien plus définies que dans la phase COD ce qui implique des interactions plus facilement décrites en termes de réseaux de liaisons H.

#### *iv. Oxalate de calcium amorphe (ACO) :*

Il existe également une phase désordonnée d'oxalate de calcium, dite amorphe. On peut la détecter dans certains calculs avant qu'elle ne subisse une transformation cristalline. Ainsi Xie *et coll.* [4] proposent un schéma de formation des calculs rénaux faisant apparaître en premier lieu l'ACO avant cristallisation des différentes phases minérales (Figure 1-5).

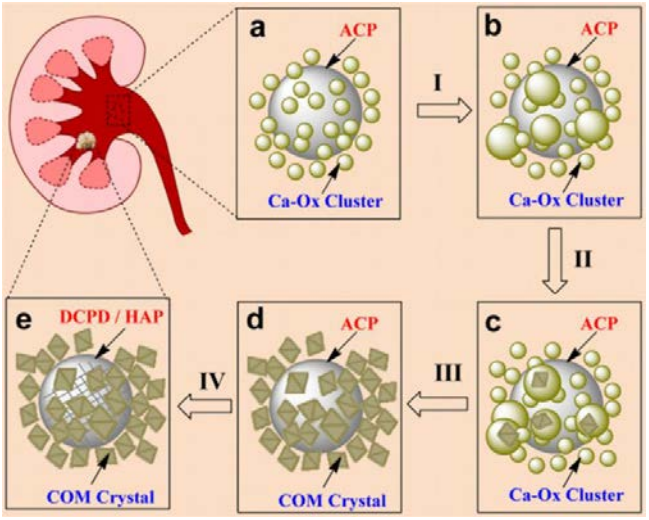



**Figure 1-5 : Schéma de la formation de calculs rénaux autour d'une plaque de Randall, d'après** [4]**.**

Sur la Figure 1-5, la phase amorphe apparaît en a, b et c (notée Ca-Ox Cluster). Elle est proposée comme étant la phase d'oxalate de calcium précédant la cristallisation du COM. Le centre de nucléation (noté ACP sur le schéma) est la plaque dite de Randall [20] : celle-ci fera l'objet d'une étude détaillée dans la suite de cette thèse (Chapitre 4). Actuellement, il est admis que la plaque de Randall correspond à un noyau d'hydroxyapatite substituée par des ions carbonates. L'état de cette hydroxyapatite est supposé comme étant amorphe (ACP) ou mal cristallisée.

Etant instable, toutes les analyses concernant la phase amorphe n'ont pas pu être réalisées à ce jour. Cette phase semble donc représenter un état préliminaire à la formation des phases cristallines d'oxalate de calcium : sa transformation semble rapide et difficilement contrôlable *in vitro*.

### *v. Oxalate de calcium anhydre (COAnh) :*

De formule $CaC_2O_4$, elle est absente des calculs rénaux mais reste néanmoins utile à étudier afin de mieux appréhender les résultats obtenus à partir des phases de réel intérêt. Elle se présente sous une structure monoclinique, de groupe d'espace **P2/m** [9]. Elle est tout particulièrement étudiée dans le cadre d'analyses thermiques des différents oxalates de calcium hydratés (voir paragraphe 1.d).iv.) [21].

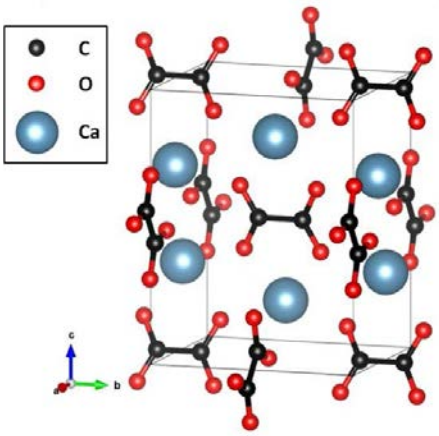



**Figure 1-6 : Représentation de la structure cristalline de COAnh, $CaC_2O_4$, d'après** [9]**.**

Hochrein *et coll.* [9] proposent une structure de la phase anhydre représentée sur la Figure 1-6.

Tableau 1-4 : Paramètres de maille et coordonnées atomiques de la phase COAnh, $CaC_2O_4$ d'après [9].

| Paramètres de maille | β (°) | a (Å) | b (Å) | c (Å) |
|---|---|---|---|---|
| **Expérimentaux** | 90,240 | 6,1644 | 7,3623 | 9,5371 |
| **Atome** | | x | y | z |
| **C(1)** | | 0.5000 | 0.1081 | 0.0000 |
| **C(2)** | | 0.5000 | 0.6081 | 0.5000 |
| **C(3)** | | 0.0929 | 0.5000 | -0.0577 |
| **Ca(1)** | | 0,4070 | 0,5000 | 0,1930 |
| **Ca(2)** | | 0.4340 | 0.0000 | 0.3180 |
| **C(4)** | | 0.0798 | 0.0000 | 0.5659 |
| **O(1)** | | 0.5596 | 0.1880 | -0.1136 |
| **O(2)** | | 0.4636 | 0.6880 | 0.3820 |
| **O(3)** | | 0.0319 | 0.5000 | -0.1869 |
| **O(4)** | | 0.2900 | 0.5000 | -0.0133 |
| **O(5)** | | 0.0079 | 0.0000 | 0.3120 |
| **O(6)** | | 0.2850 | 0.0000 | 0.5404 |

Toutes les structures cristallines évoquées ci-dessus sont issues d'études par DRX et les données essentielles de celles-ci sont récapitulées dans le Tableau 1-5 :

Tableau 1-5 : Récapitulatif des données relatives à COM, COD, COT, ACO et COAnh.

| Phase | Nom | Groupe d'espace | Nombre de molécule d'eau | Particularité | Présence dans les calculs rénaux [5] |
|---|---|---|---|---|---|
| **COM** | whewellite | $P2_1/c$<br>$I2/m$ | 1 | stable | ~ 70 % |
| **COD** | weddellite | $I4/m$ | 2+x (x<1) | métastable<br>zéolithe | ~ 20 % |
| **COT** | caoxite | $P\bar{1}$ | 3 | métastable | ~ < 1 % |
| **ACO** | | | ? | métastable | inconnue |
| **COAnh** | | P2/m | 0 | métastable | nulle |

### b) Produits thermodynamiques et cinétiques

Les phases d'oxalate de calcium obtenues ont des propriétés thermodynamiques totalement différentes, qui peuvent expliquer leur présence (ou non) au sein des calcifications pathologiques. En effet, le seul composé thermodynamiquement stable est l'oxalate de calcium monohydraté (COM) : c'est également le plus détecté chez les patients souffrant de lithiase urinaire [5]. Tous les autres composés sont dits métastables et ont tendance à se transformer au cours du temps en la phase la plus stable. Cela a une influence sur les synthèses mises en œuvre au cours de cette thèse. En effet, des conditions particulières ont dues être déterminées afin d'obtenir COD et COT en tant que phases pures. Selon les conditions, les produits cinétiques COD et COT pourront donc être formés. Conti *et coll.* [14] ont réalisé un travail important sur la stabilité de la phase COD dans différentes conditions de synthèse (voir Tableau 1-6).

**Tableau 1-6 : Transformation de nanocristaux de weddellite (COD) en whewellite (COM) en fonction de différentes conditions expérimentales d'après** [14].

| Experimental conditions | Approximate induction time | Complete transformation |
|---|---|---|
| Laboratory atmosphere | 10 days | 45 days |
| Standing in dry air | — | — |
| Immersion in $H_2O$ | Few minutes | 2 hours |
| Immersion in ethanol | 14 days | 100 days |

Ces travaux ont été analysés par DRX et IR. De façon assez contradictoire, la transformation est initiée plus rapidement dans un milieu humide, voire en immersion totale dans l'eau. Les auteurs n'ont en revanche pas testé le stockage à différentes températures. Les analyses ATD/TG montrent logiquement que la déshydratation est plus facile à des températures élevées. Au cours de cette thèse, les échantillons métastables ont été conservés dans un réfrigérateur (T < 4°C). Ils ont ainsi pu être conservés intacts sur une très longue période, à l'inverse des mêmes échantillons conservés dans le laboratoire à température ambiante.

### c) Synthèses mises en œuvre

#### *i. Les trois hydrates d'oxalate de calcium*

Il existe d'ores et déjà de nombreuses synthèses pour les oxalates de calcium. Walter-Levy *et coll.* [22] ont fait un travail exploratoire en fixant la température de synthèse à 12°C et en faisant varier le pH et la concentration des solutions. Les auteurs ont pu définir des domaines de prédominance de formation des différents hydrates, leur travail étant basé sur celui antérieur de Hammarsten [23]. Grases *et coll.* [24] décrivent également les protocoles de synthèse des trois hydrates. Cependant ils utilisent différents ajouts (tels que le chlorure d'ammonium) afin de modifier le milieu de synthèse (pH), notamment pour le COT. Notre but est, ici, de le synthétiser en ne modifiant que les paramètres de synthèses tels que la concentration ou la température. La synthèse du COD reste remarquable puisqu'elle implique sûrement un passage par l'oxalate de calcium amorphe (ACO) non discuté dans cette publication. Plus spécifiquement, Millan [25] analyse la formation puis la croissance de la whewellite : cette publication explicite de façon remarquable l'évolution de la morphologie des cristaux de COM. La synthèse du COD sans ajout est assez peu décrite dans la littérature [26]. De nombreuses publications (comme Doherty *et coll.* [27]) proposent d'utiliser un chélatant (comme le citrate) pour obtenir des morphologies caractéristiques de COD. Ces synthèses seront reprises dans une partie ultérieure (Chapitre 5 partie 1). Il est à noter que Wiedemann *et coll.* [28] ont semble-t-il réussi à obtenir du COD en ne jouant que sur des paramètres de synthèse sans ajout de solution tampon ou de chélatants. Les auteurs précisent bien la difficulté de cette synthèse, ce qui laisse supposer l'obtention d'échantillons non purs. Le COT a quant à lui pu être formé à l'aide d'une synthèse originale par Deganello *et coll.* [17] : de la whitlockite, $Ca_9(MgFe)(PO_4)_6PO_3OH$, a été plongée dans de l'acide oxalique pendant une semaine. Il existe évidemment beaucoup d'autres synthèses pour ces hydrates. On notera par exemple les travaux de Daudon, Tiselius et Tomazic [1], [29], [18]. Les différents protocoles mis en œuvre au cours de cette thèse sont les suivants :

- Protocole de synthèse par goutte à goutte (g/g) :

La synthèse des trois principaux hydrates (COM, COD et COT) consiste en une précipitation contrôlée par simple ou double goutte à goutte, (montage a) sur la Figure 1-7). Les paramètres tels que la concentration des réactifs, la température, le temps de vieillissement, l'agitation ont été modifiés afin de réaliser la synthèse de phases pures sans modification du milieu par l'ajout de solution tampon. Le COM étant le plus stable thermodynamiquement, il est aisément synthétisé. Une grande quantité (~ 1 g) peut être obtenue rapidement grâce à une synthèse en forte concentration ($[C_{réactifs}]$ = 0,100 M) à température ambiante. En ce qui concerne le COD et le COT, il a fallu adapter les conditions de synthèses : ainsi, le COD a pu être obtenu à basse température (bain de glace 4-7°C) et à des concentrations élevées mais surtout en présence d'un excès de précurseur de calcium important (Ca/Ox = 10). Le COT a lui été obtenu en faible quantité (~ 50 mg) avec des concentrations en réactifs plus faibles ($[C_{réactifs}]$ = 0,001 M) et surtout avec une agitation magnétique uniforme (plus importante que pour COM et COD).

Ces synthèses très reproductibles ont permis d'obtenir des quantités suffisantes de composés pour les analyses classiques décrites ci-dessous. Cependant, en ce qui concerne l'étude des morphologies par MEB, il a fallu travailler à plus basses concentrations afin de limiter la précipitation trop rapide qui ne permet pas d'obtenir de morphologie caractéristique. Dans ces conditions, le COT est toujours présent (minoritairement ou majoritairement). L'arrêt de l'agitation pose le problème de la répétabilité des manipulations. Le Tableau 1-7 récapitule les paramètres de synthèse optimaux pour obtenir les trois hydrates purs.

**Tableau 1-7 : Récapitulatif des paramètres pour les synthèses de COM, COD et COT.**

| Phase | [Ca] | [Ox] | Température | Remarque |
|---|---|---|---|---|
| **COM** | 0,100 M | 0,100 M | 40°C ou $T_{amb}$ | |
| **COD** | 1,000 M | 0,100 M | < 7°C | g/g Ox dans Ca |
| **COT** | 0,001 M | 0,001 M | < 7°C | agitation magnétique importante |

Ce tableau ne montre qu'un seul type de synthèse conduisant aux phases pures. Néanmoins, pour chaque hydrate, plusieurs synthèses ont conduit à celui-ci. Ainsi, le COM a pu être obtenu à différentes températures, avec différents temps de vieillissement, *etc*. Le paramètre important pour obtenir le COD est l'excès de calcium (à forte concentration) : faire goutter la solution d'oxalate dans celle de calcium est un moyen d'augmenter cet excès, bien que la stœchiométrie à l'instant t ne soit de ce fait pas connue. Le COT a été synthétisé à faible concentration, à température ambiante ou à froid (< 7°C), sans réelle influence de la stœchiométrie, mais systématiquement sous forte agitation.

- Protocole de synthèse par croissance en gel :

Ces synthèses visent, à l'origine, à modifier la croissance des cristaux des différents hydrates d'oxalate de calcium. Un gel (gélatine, agar-agar, gel de silice) est placé dans un tube en U (Figure 1-7b). A chacune des extrémités, un réactif en solution est délicatement déposé (chlorure de calcium, oxalate de sodium ou acide oxalique). La migration de ces réactifs permettra une croissance plus lente conduisant à des cristaux de plus grande taille, ainsi que la possibilité d'obtenir des morphologies différentes. La réelle difficulté réside dans la récolte des cristaux et dans leur

nettoyage pour l'analyse par MEB. Un même type de synthèse a déjà été proposé plusieurs fois dans la littérature, par exemple par Franchini-Angela *et coll.* en 1979 [30].

- Protocole de synthèse par diffusion d'ammoniac :

Cette synthèse respecte le protocole expérimental mis en place par Chen *et coll.* [31], le but principal étant ici de reproduire les expériences et de modifier certains réactifs afin de contrôler l'obtention des différentes phases d'oxalates de calcium hydratés (voir Figure 1-7 c)). Pour cette synthèse, on place dans un premier bécher les réactifs ($CaCl_2$ et $Na_2C_2O_4$) à un pH acide (pH= 2,0 par ajout d'HCl) et dans un second une solution d'ammoniaque. Ces deux béchers sont ensuite mis dans un grand cristallisoir fermé. L'ammoniac va lentement diffuser dans l'espace clos, et conduire progressivement à l'augmentation du pH de la solution des réactifs, permettant de ce fait la formation des ions oxalates et donc la cristallisation de la phase souhaitée. C'est une méthode très utilisée en biominéralisation [32], notamment pour la synthèse d'apatite. Elle souffre cependant de quelques inconvénients : il faut utiliser les mêmes volumes de verreries pour assurer la répétabilité des expériences, et maintenir un contrôle suffisamment précis de la température (et donc de la diffusion d'ammoniac).

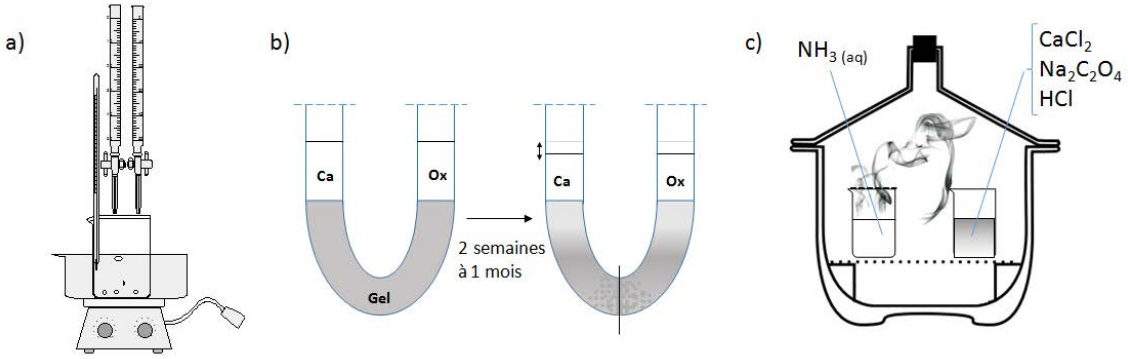



**Figure 1-7 : Schéma des différents montages de synthèse utilisés a) goutte à goutte, b) en gel et c) par diffusion d'ammoniac. Ca : chlorure de calcium ; Ox : oxalate de sodium ou acide oxalique.**

La méthode par diffusion d'ammoniac n'a été utilisée que pour la synthèse d'oxalate de calcium en présence d'ajout, ici le thé vert contenant des catéchines, chélatants potentiels du calcium (voir Introduction générale et Chapitre 5). Les synthèses en gel peuvent également être considérées comme impliquant des ajouts en « elles-mêmes » (les gels n'étant pas inertes vis-à-vis des cristaux formés). Ces deux types de synthèses seront repris ultérieurement. Seules les synthèses avec double burettes ont permis d'obtenir des phases COM, COD, COT pures en ne jouant que sur certains paramètres, sans aucun ajout et sans action particulière sur le pH.

### *ii. L'oxalate de calcium anhydre, COAnh*

La phase anhydre $CaC_2O_4$ a été obtenue en traitant thermiquement un composé synthétisé au préalable (COM) dans une étuve à 190°C. Les températures choisies pour la déshydratation sont établies suite à une analyse par ATD/TG : la température de 190°C semble suffisante pour amorcer la déshydratation du COM (voir partie 1. d) *iv*. de ce Chapitre). Cette phase est difficile à conserver car hygroscopique.

### iii. *La phase amorphe d'oxalate de calcium, ACO*

De récentes études [33], [34], [35] ont montré un regain d'intérêt pour l'étude d'un intermédiaire amorphe précédant la cristallisation du COM. L'existence et l'importance d'une phase ACO dans les calcifications pathologiques semble dorénavant plus que probable. Ces travaux proposent différentes voies de synthèses pour celle-ci. Il est intéressant d'obtenir cette phase sous forme pure, afin d'envisager son analyse complète et de comprendre la manière dont elle intervient éventuellement dans la formation des calculs rénaux, ainsi que son influence sur la différenciation en COM, COD ou COT. La synthèse mise en œuvre au laboratoire est celle proposée par Ihli *et coll.* [33], [36] (Figure 1-8) : elle consiste en la lyophilisation d'une solution saturée en oxalate de calcium.

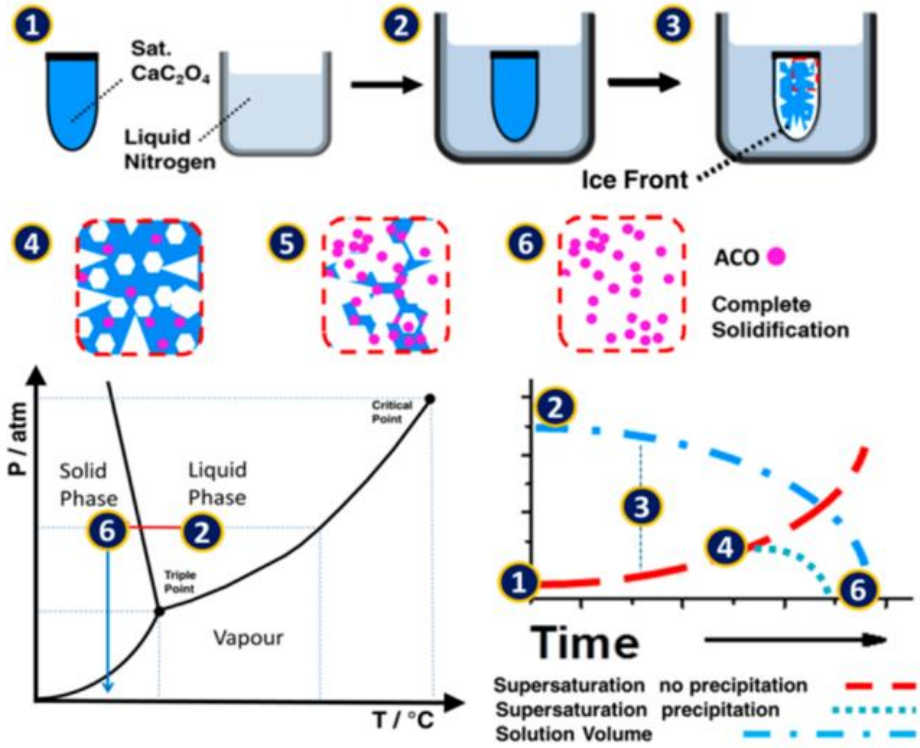



**Figure 1-8 : Synthèse d'ACO par lyophilisation d'après** [33]**.**

Comme le montre le schéma de la Figure 1-8, la synthèse consiste à geler une solution saturée en oxalate de calcium dans l'azote liquide, puis à lyophiliser l'ensemble jusqu'à disparition totale de la glace. Le lyophilisateur utilisé est un Bioblock scientific Alpha 2-4 LD. La lyophilisation s'effectue à – 80°C et à 0,005 mbar. Cette voie de synthèse est assez simple à mettre en place mais ne permet d'obtenir que peu d'échantillon (~ 5 mg). De plus, il faut rapidement analyser l'échantillon ACO afin d'éviter toute cristallisation ultérieure.

## d) Méthodes de caractérisation

Les matériaux synthétisés ont été analysés selon le protocole suivant : (i) analyse par spectroscopie infrarouge, directement effectuée après la synthèse, (ii) analyse par diffraction des rayons X quand la quantité de produit obtenue le permettait. Pour l'observation des morphologies de cristaux, les échantillons ont été observés par MEB. Après avoir synthétisé avec succès les différentes phases pures des oxalates de calcium (hydratés ou non, cristallisés ou non), leurs analyses ont été utilisées

comme points de départ pour la caractérisation d'échantillons naturels (calculs rénaux, voir Chapitre 4).

### *i. Spectroscopie infrarouge (FTIR)*

Dans le milieu hospitalier, les médecins utilisent couramment la spectroscopie infrarouge afin de déterminer la nature des phases présentes dans les calculs rénaux : il s'agit d'un outil de diagnostic rapide à mettre en œuvre. Cette spectroscopie permet d'identifier les bandes de vibrations caractéristiques de l'échantillon. Il est très important d'avoir caractérisé les phases majoritaires pures au préalable afin de pouvoir déconvoluer les spectres. Les oxalates de calcium ont largement été analysés par FTIR. Petrov *et coll.* [37] font une description précise de la whewellite et proposent un grand nombre d'attributions des bandes de vibrations. Ils s'intéressent en particulier aux vibrations de type « overtone » afin d'expliquer le nombre de bandes de vibration dans la région $\nu_{(OH)}$ (entre 3500 et 3000 $cm^{-1}$). Shippey *et coll.* [38] reprendront ce travail quelques années plus tard en y ajoutant certaines modifications, ainsi que l'analyse de la phase anhydre (COAnh). Depuis lors, toutes les phases ont été analysées et les attributions n'ont cessé d'être plus précises que ce soit pour COD [39], [40] ou pour COT [12], [41]. De telles attributions ont été rendues possibles, du moins pour les plus récentes, grâce à l'aide de calculs théoriques ou de méthodes d'analyses élaborées (par exemple synchrotron [42]). Tous ces travaux ont été bénéfiques à l'étude des calcifications pathologiques, [43], [44], [45], [46] permettant ainsi une identification non ambigüe des phases majoritaires et minoritaires dans les calculs.

Les phases d'oxalates de calcium synthétisées ont toutes été analysées « post-synthèse » par spectroscopie infrarouge. Certaines ont été suivies au cours du temps afin de vérifier leur stabilité (notamment COD et COT). Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre Perkin-Elmer spectrum 400 FT-IR. Au laboratoire, il a été possible d'utiliser deux types de préparation et d'analyse des échantillons :

- l'analyse par ATR (*Attenuated Total Reflectance*) : elle ne nécessite aucune préparation particulière. Une masse de produit (suffisante pour couvrir le cristal de détection, de l'ordre du mg) est placée sur l'analyseur, puis à l'aide d'un système de presse appliqué à l'échantillon pour assurer une meilleure homogénéité, le spectre peut alors être enregistré. La gamme spectrale est de 4000 à 650 $cm^{-1}$ (voire 550 $cm^{-1}$).
- l'analyse en pastille de KBr par transmission : il s'agit de l'analyse la plus courante en spectroscopie IR. Elle permet de couvrir une plus large gamme spectrale (de 4000 à 450 $cm^{-1}$) et une meilleure résolution. Il faut peser environ 1 mg d'échantillon et y ajouter 100 mg de KBr : ce mélange est alors broyé puis pastillé. La pastille peut ensuite être analysée en transmission. Il est à noter que cette méthode de préparation peut être invasive pour certains composés : en effet, les échantillons métastables suite au broyage/pastillage peuvent spontanément se transformer dans la forme la plus stable. De plus, le KBr étant hygroscopique, il peut en quelque sorte « drainer » l'eau de certains composés, accélérant leur transformation.

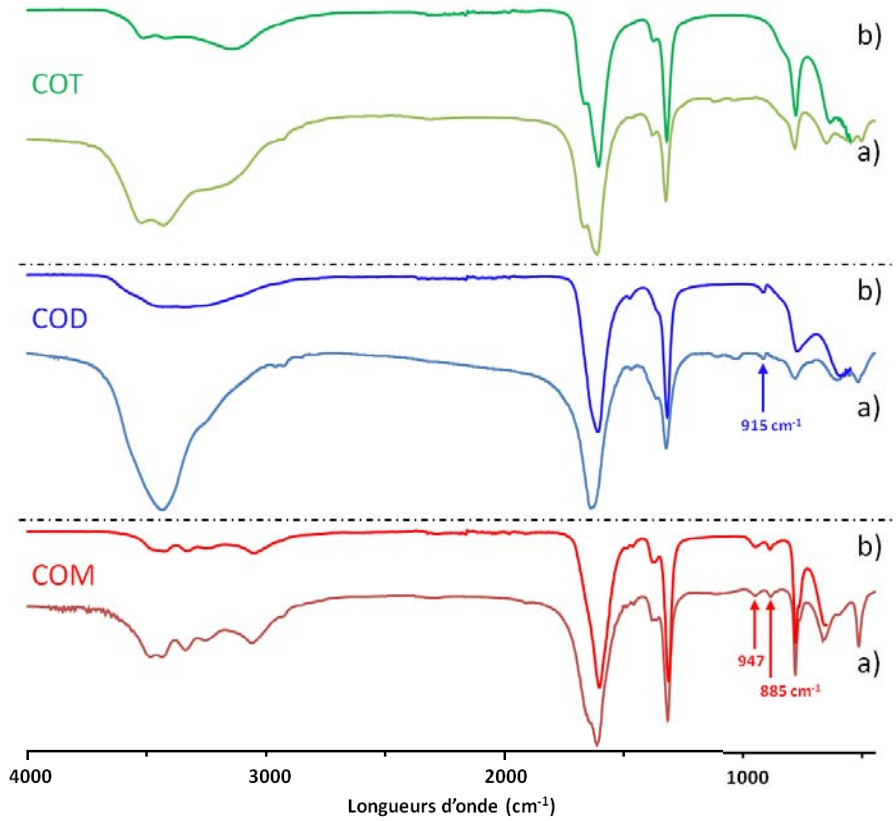



**Figure 1-9: Spectres IR de COM (rouges), COD (bleus) et COT (verts) synthétiques. Pour chaque phase, le spectre du bas (a) a été enregistré en pastille de KBr alors que celui du haut (b) l'a été à l'aide d'un module ATR.**

La Figure 1-9 présente les spectres FTIR des trois hydrates COM, COD et COT analysés par les deux méthodes IR décrites ci-dessus (ATR et pastille de KBr). La résolution en utilisant la pastille de KBr (spectres du bas) est supérieure à celle du montage ATR. Les spectres présentés n'ont subi aucune transformation durant la préparation de la pastille. En général une différence notable entre les spectres se situe dans la zone entre 3700 et 2700 $cm^{-1}$, correspondant au mode de vibration d'élongation $\nu_{(OH)}$. Cette zone est très élargie dans le cas du COD du fait de la présence des molécules d'eau de type zéolithique. Le COM présente également deux bandes, à 947 et 885 $cm^{-1}$, attribuées aux librations des molécules d'eau, qui lui sont propres. Le COD présente une bande de vibration à 915 $cm^{-1}$ (non attribuée !) alors que le COT ne présente aucune bande dans cette région. On peut noter la présence de certaines bandes de combinaisons qui peuvent être observées lorsque deux (ou plus) vibrations fondamentales sont excitées simultanément. Par exemple, la bande de vibration à 2937 $cm^{-1}$ pour le COD peut être une bande de combinaisons entre deux élongations $\nu_{a,s(CO_2)}$ ; 1610 + 1319 = 2929 $cm^{-1}$ [38]. Il peut correspondre plusieurs combinaisons à une bande de vibration donnée, ce qui rend l'attribution beaucoup plus complexe. Ci-dessous, on trouvera une tentative d'attributions réalisée à partir des spectres expérimentaux et à l'aide des publications de Shippey, Conti et Petrov [38], [41] et [37] :

**Tableau 1-8 : Attributions des bandes de vibrations IR (en $cm^{-1}$) des trois phases COM, COD et COT, d'après [38], [41] et [37].**

| COM | COD | COT | Attributions |
|---|---|---|---|
| | 3559 – 3257 m, vb | 3511 w | Elongation O-H $\nu_{(OH)}$ |
| 3468 m, sh | | | Elongation O-H $\nu_{(OH)}$ |
| 3427 m | | | Elongation O-H $\nu_{(OH)}$ |
| | | 3416 w | Elongation O-H $\nu_{(OH)}$ |
| 3330 m | | | Elongation O-H $\nu_{(OH)}$ |
| 3252 w | | | 2 Cisaillement H-O-H $2\delta_{(HOH)}$ |
| | | 3143 m, b | Elongation O-H avec liaison H plus forte |
| 3049 m, b | | | Elongation O-H $\nu_{(OH)}$ |
| 2937 w, sh | 2936 vw, sh | 2936 vw, sh | Combinaison |
| | 2785 vw, sh | 2785 vw, sh | Combinaison |
| 1651 vs, sh | | 1663 s, sh | Cisaillement H-O-H $\delta_{(HOH)}$ |
| 1602 vs | 1610 vs | 1606 vs | Elongation antisym $CO_2$ $\nu_{a(CO_2)}$ |
| 1561 w, sh | | | |
| 1487 w | | | |
| 1462 w | 1475 w | | Elongation sym $CO_2$ $\nu_{s(CO_2)}$ |
| 1379 m | | 1377 w | Combinaison |
| 1369 w, sh | 1363 w, sh | | Combinaison |
| 1312 vs | 1319 vs | 1319 vs | Elongation sym $CO_2$ $\nu_{s(CO_2)}$ |
| 947 w, b | | | Libration $H_2O$ $\nu_{R(H_2O)}$ |
| | 915 w | | |
| 885 m | | | Libration $H_2O$ $\nu_{R(H_2O))}$ |
| 863 w | | | Elongation C-C $\nu_{(CC)}$ |
| | | 830 w, sh | Libration $H_2O$ $\nu_{R(H_2O)}$ |
| 778 s | 770 s, b | 778 s, b | Déformation de pliage O-C-O $\delta_{(OCO)}$ |
| 656 s | | | Libration $H_2O$ $\nu_{R(H_2O)}$ |

'v' pour *very*, 's' pour *strong*, 'm' pour *medium*, 'w' pour *weak*, 'b' pour *broad*, et 'sh' pour *shoulder*.

Le principal inconvénient de cette technique reste la difficile quantification dans le cas de mélanges. Il est en effet compliqué de reconnaître la présence (ou non) des hydrates. Une large majorité des calculs rénaux ne sont pas purs et présentent donc différents taux de phases inorganiques. Cohen-Solal *et coll.* [47] proposent un logiciel permettant de quantifier les différents minéraux dans un calcul mais mettent aussi en lumière certaines difficultés de la méthode. La Figure 1-10 montre un test effectué avec des mélanges de COM et de COD synthétiques, en faisant varier le rapport massique des deux composés.

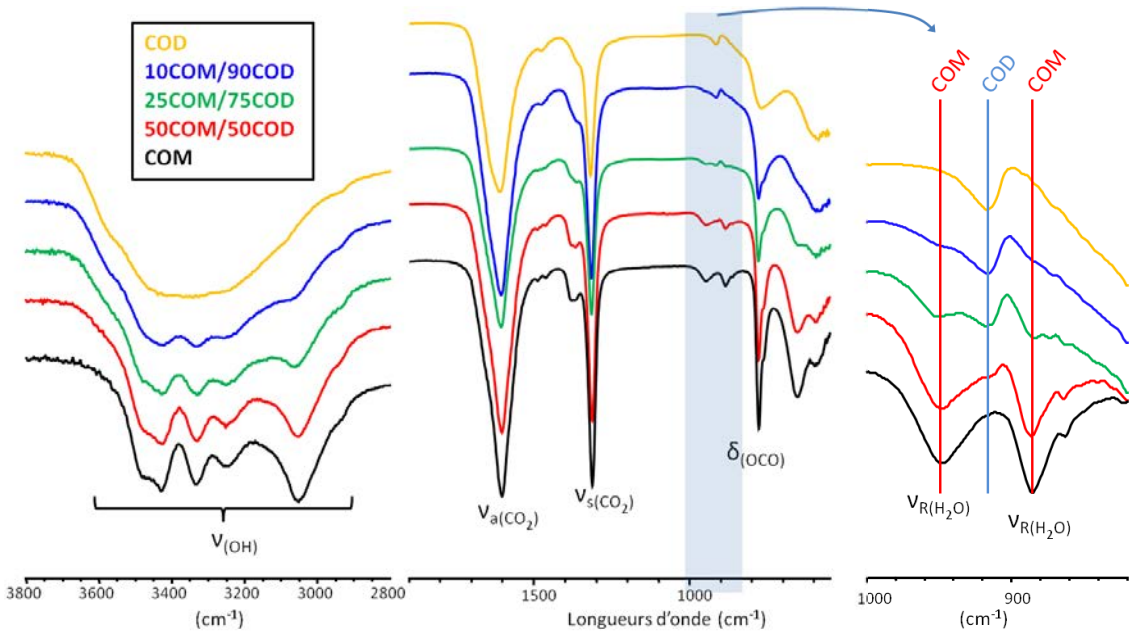



**Figure 1-10 : Spectres infrarouges (ATR) de mélanges COM/COD. (X COM/(100-X) COD).**

On remarque aisément que les proportions massiques des phases COM et COD sont difficilement quantifiables à partir des spectres de mélanges. De plus, dans le cas des calculs rénaux, les spectres FTIR sont encore moins explicites de par la présence de composés organiques et d'autres phases minérales, rendant la quantification encore plus délicate.

Des mesures IR à basse température (8 K) ont été réalisées. Ces dernières sont caractérisées par une résolution nettement supérieure par rapport aux mesures à température ambiante et sont une aubaine pour une comparaison avec des calculs DFT.

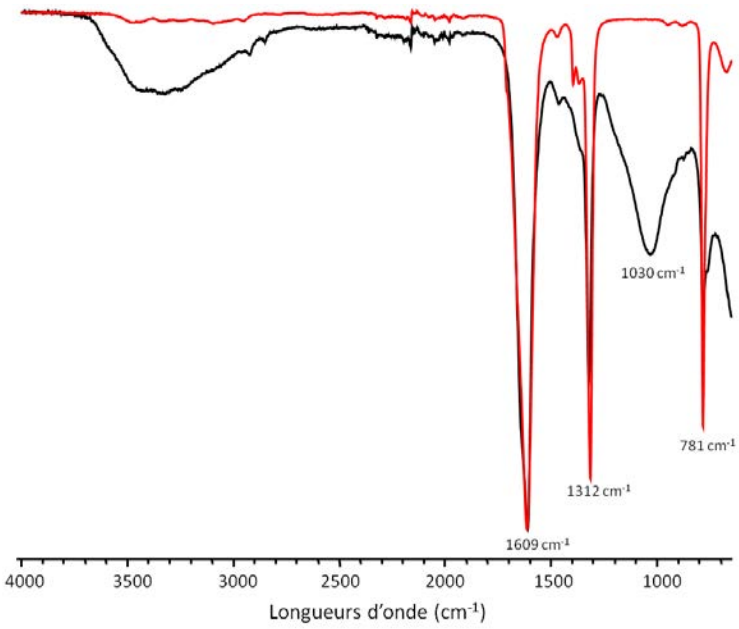



**Figure 1-11 : Spectres IR (mode ATR) d'ACO (en noir) et COAnh, $CaC_2O_4$ (en rouge).**

Sur la Figure 1-11, nous présentons les spectres des phases anhydre et amorphe. On peut noter que le COAnh n'a pas été totalement déshydraté : cela est confirmé par la présence des bandes de

vibrations de très faible intensité entre 3800 et 2700 $cm^{-1}$ ($\nu_{(OH)}$) ainsi que deux signaux peu intenses à 947 et 885 $cm^{-1}$ attribués aux librations de l'eau. Le reste du spectre présente les signaux attribués aux groupements oxalates (Tableau 1-8). Pour l'ACO, il existe moins de références dans la littérature pour l'attribution des différents signaux. Cependant, les quelques publications présentant un spectre FTIR de cette phase [33], [35] ont des spectres similaires au nôtre. La zone des $\nu_{(OH)}$ (3800-2700 $cm^{-1}$) est élargie et peut être comparée à la même zone pour COD. Il y a l'apparition d'un signal large et intense à 1030 $cm^{-1}$ qui n'a pas été attribué.

### *ii. Spectroscopie Raman*

La spectroscopie Raman est complémentaire de l'infrarouge : elle est fondée sur la modulation de la diffusion de la lumière par les vibrations des molécules. Une vibration est active en Raman si elle provoque un changement de polarisabilité. Dans la littérature, les analyses par spectroscopie Raman vont de pair avec les analyses FTIR. Shippey *et coll.* [38] semblent avoir décrit pour la première fois le spectre Raman du COM avec ses attributions ainsi que celui de la phase anhydre (COAnh). Les spectres Raman du COD et du COM ont été reportés par Kodati *et coll.* [48]. Une quantification a aussi été proposée dans le cas d'un mélange de COM et de COD. L'article récent de Conti [41] présente quant à lui une étude spectroscopique complète FTIR et Raman de la phase trihydratée (COT). L'étude de calculs rénaux a pu être menée à l'aide des spectres de références de COM, COD et COT [49], [50]. Les études plus anciennes évoquent le problème de la fluorescence en spectroscopie Raman [51], [49] évoqué ci-après (voir l'étude des cristaux de COM et COD obtenus en montages microfluidiques, Chapitre 5). Les différents hydrates synthétisés au laboratoire ont été analysés par spectroscopie Raman (Kaiser Optical System, Raman Analyzer RXN1 microprobe équipé d'une diode laser à 785 nm couplé avec un microscope LEICA). Il s'agit une fois encore d'une méthode rapide, non invasive et non destructrice.

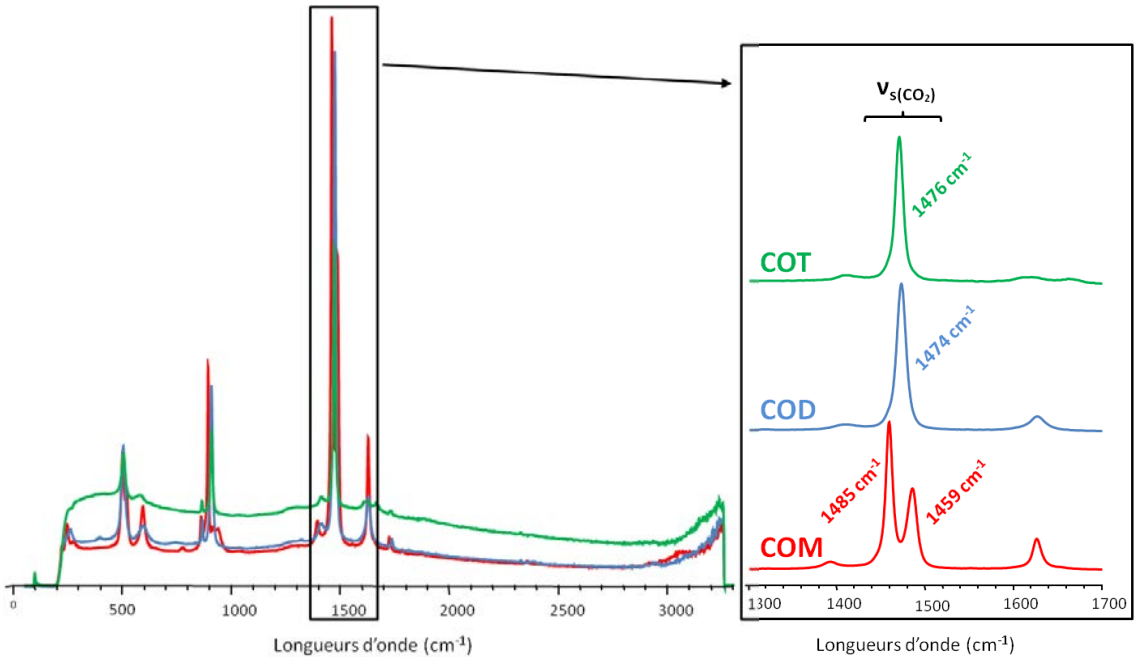



**Figure 1-12 : Spectres Raman des trois hydrates d'oxalates de calcium : COM (rouge), COD (bleu) et COT (vert) (λ = 785 nm).**

La Figure 1-12 présente le résultat de cette analyse. La zone entre 1700 et 1300 $cm^{-1}$ permet de différencier clairement le COM des deux autres phases. Ce point sera essentiel lors de la caractérisation de cristaux obtenus en système microfluidique (voir Chapitre 5). La différence entre COD et COT pour la bande de vibration ($\nu_{s(CO_2)}$) est plus faible et réside dans un léger shift de 2 $cm^{-1}$ qui reste néanmoins détectable. La prise en compte de l'ensemble du spectre permet cependant de distinguer sans difficulté les phases COD et COT. Le COM présente deux signaux pour l'élongation symétrique $\nu_{s(CO_2)}$ ce qui indique que les ions oxalates occupent deux ensembles différents de sites et que les modes d'élongation ne sont pas équivalents, [52].

**Tableau 1-9 : Bandes Raman (en $cm^{-1}$) (λ = 785 nm) des trois phases COM, COD et COT synthétiques** [41], [38], [52].

| COM | COD | COT | Attributions |
|---|---|---|---|
| **1722 w** | **1736 w** | **1727 w** | Combinaison |
| | | **1663 w, b** | Déformation O-H $\delta_{(OH)}$ |
| **1626 m** | **1629 m** | | Elongation antisym C-O $\nu_{a(CO_2)}$ |
| | | **1614 w, b** | |
| **1485 s** | **1474 vs** | **1476 vs** | Elongation sym C-O $\nu_{s(CO_2)}$ |
| **1459 vs** | | | Elongation sym C-O $\nu_{s(CO_2)}$ |
| **1392 w** | **1409 w** | **1409 w** | Combinaison |
| **936 w** | | | Libration $H_2O$ $\nu_{R(H_2O)}$ |
| **913 w, sh** | **908 s** | **907 s** | Déformation en phase sym O-C-O |
| **894 s** | | | Elongation C-C $\nu_{(CC)}$ |
| **859 m** | **865 w** | **863 w** | Elongation C-C $\nu_{(CC)}$ |
| **777 w** | | | Déformation de pliage O-C-O $\delta_{(OCO)}$ |
| **592 m** | **594 m** | **581 w, b** | Bascule O-C-O $\rho_{(OCO)}$ |
| **516 m, sh** | | | Bascule O-C-O $\rho_{(OCO)}$ |
| **500 m** | **505 m** | **504 m** | Bascule O-C-O $\rho_{(OCO)}$ |

'v' pour *very*, 's' pour *strong*, 'm' pour *medium*, 'w' pour *weak*, 'b' pour *broad*, et 'sh' pour *shoulder*.

La Tableau 1-9 résume les attributions des signaux Raman, certaines de ces attributions étant encore sujettes à caution dans la littérature. Sur la Figure 1-12, le spectre du COT présente une ligne de base plus distordue que pour les deux autres phases : ce phénomène est dû à la fluorescence ; la lumière absorbée excite les électrons du matériau à des niveaux d'énergie plus élevés pendant un temps très court. Le retour à l'état fondamental plus lent des électrons provoque une perte d'énergie et donc une longueur d'onde différente. Pour éviter ce phénomène, la longueur d'onde du faisceau incident peut être modifiée. Guerra-López et Tonannavar ont utilisé un faisceau à 1064 nm [53], [43]. Cependant, il est parfois difficile de l'éliminer totalement et cela est même parfois impossible. Les échantillons naturels (calculs rénaux) sont difficilement analysables par spectroscopie Raman du fait de ce phénomène : il masque généralement le spectre Raman du matériau d'intérêt. Avec un matériel adéquat (laser à grande longueur d'onde, par exemple 1064 nm) il est possible de réduire ce phénomène de fluorescence [54]. De la micro imagerie Raman est également envisageable.

Couplé à un microscope, cette technique présente de nombreux avantages. Il est en effet possible d'effectuer des cartographies micro-Raman. Cette technique a été utilisée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire PHENIX à l'UPMC pour les synthèses d'oxalates de calcium en canaux microfluidiques (voir Chapitre 5).

### iii. *Diffraction des rayons X (DRX)*

Les diffractogrammes présentés dans ce manuscrit ont tous été enregistrés à l'aide d'un diffractomètre Bruker D8 fonctionnant en mode de réflexion Bragg-Brentano et équipé d'un filtre en nickel pour sélectionner la raie $K_\alpha$ du cuivre (1,541 Å).

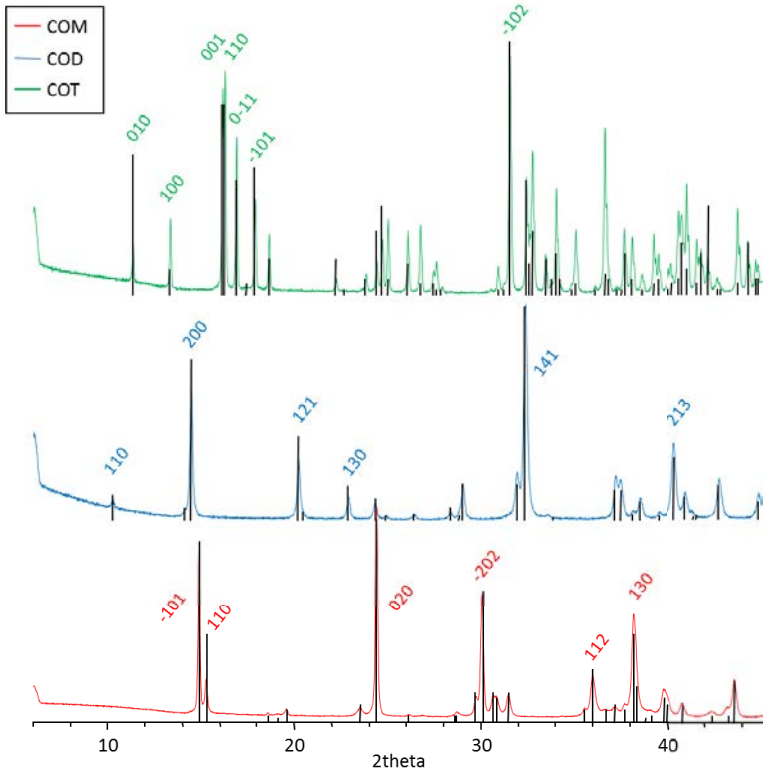



**Figure 1-13 : Diffractogrammes de COM (rouge), COD (bleu) et COT (vert) synthétiques avec les attributions des indices de Miller. Les données des fiches JCPDS apparaissent en noir.**

Pour préparer l'échantillon il est nécessaire de le broyer afin d'éviter les orientations préférentielles. Lorsque les morphologies des échantillons étaient d'intérêt, l'étape de broyage pour la diffraction des rayons X n'a pas été effectuée. Les fiches JCPDS 20-0231, 75-1314 et 20-0232 ont permis l'attribution des principaux indices de Miller des phases COM, COD et COT, respectivement (Figure 1-13). Les différences d'intensité visibles pour le COT peuvent être dues à des orientations préférentielles de nos cristaux.

### iv. *Analyse thermique différentielle et thermogravimétrique (ATD/TG)*

La TG consiste en la mesure de la variation de la masse d'un composé au cours d'un cycle en température. Une masse connue de matériau est insérée dans un creuset, ce dernier est ensuite soumis à un cycle thermique selon un programme défini (ici 5°C/min sous flux d'air). Un tracé de la masse en fonction de la température est effectué. Cette méthode permet de remonter à plusieurs informations : la pureté du composé, la quantité de molécules d'eau liées au composé (structurale et/ou adsorbée) et les températures de dégradation. De par ses multiples hydrates, l'oxalate de calcium est un candidat logique pour de telles analyses : il existe d'ailleurs de nombreuses études thermiques sur ces matériaux [55], [56]. Ici, elle est utile pour connaitre le nombre exact de

molécules d'eau dans le COD, ainsi que la température à fixer pour obtenir un composé anhydre. On rappelle ici que COD correspond à une structure zéolithique de formule $CaC_2O_4 \cdot (2+x)H_2O$ avec ($x < 1$). La TG est toute désignée pour une détermination expérimentale du paramètre x. Il est à noter que le COM est souvent utilisé pour calibrer les ATG. L'ATD quant à elle permet de déceler les phénomènes thermiques (endo ou exo thermiques). Les mesures thermiques ont été effectuées à l'aide d'un appareil NETZSCH Luxx STA 409 PC.

- <u>COM</u>

La courbe d'analyse ATD/TG du COM (m = 20,448 mg) est présentée sur la Figure 1-14. On a pour le COM les pertes théoriques massiques suivantes :

$$Ca(C_2O_4)\cdot H_2O \rightarrow Ca(C_2O_4) + H_2O\uparrow$$
100 % 87,7 % 12,3 %

$$Ca(C_2O_4) \rightarrow CaCO_3 + CO\uparrow$$
87,7 % 68,5 % 19,2 %

$$CaCO_3 \rightarrow CaO + CO_2\uparrow$$
68,5 % 38,4 % 30,1 %

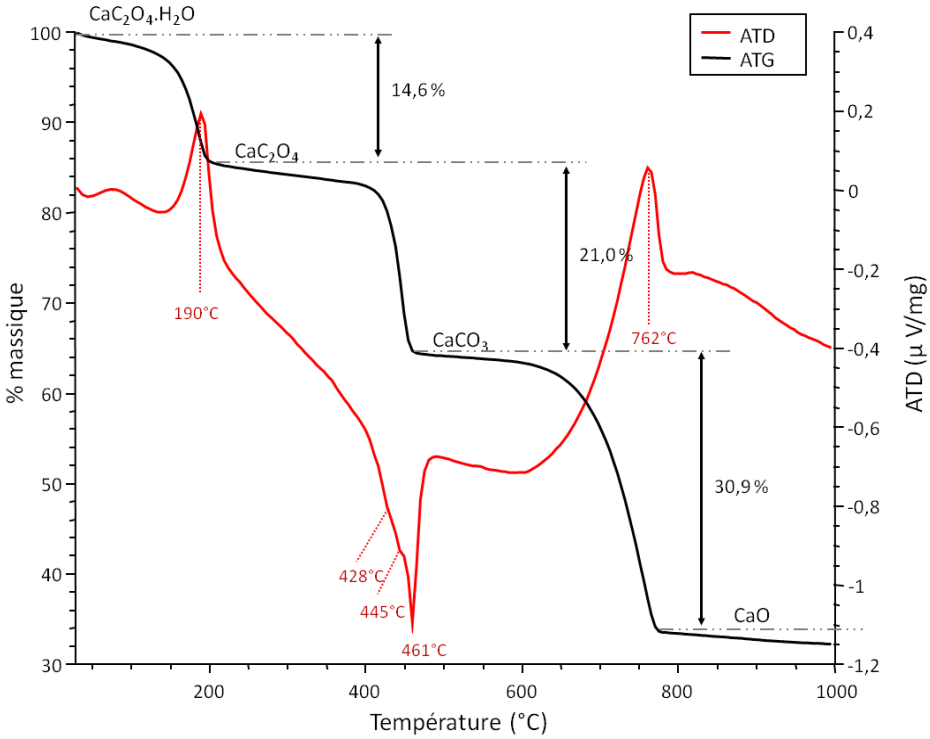



**Figure 1-14 : ATD/TG de la phase COM synthétique, 5°C/min sous flux d'air.**

On peut noter sur cette figure qu'avant la déshydratation de la molécule d'eau de structure, il existe une légère « pré-déshydratation » due aux molécules d'eau adsorbées en surface de l'échantillon.

- <u>COD</u>

Le COD a donné lieu à plus de discussion dans la littérature. Walter-Lévy *et coll.* [57] soulignent des différences en ATD/TG entre un COD à « gros grains » et son analogue à « grains fins ». Ils trouvent un nombre différent de molécules d'eau dans la structure selon la taille des grains : 2,3

et 2,7 ; respectivement. Ici, l'analyse des échantillons (Figure 1-15) obtenus par la synthèse décrite plus haut conduit à un nombre de molécules d'eau de 2,5.

Cela nous permet d'écrire le schéma de dégradation suivant pour le COD analysé (m = 20,176 mg) :

$$Ca(C_2O_4)\cdot 2{,}5H_2O \rightarrow Ca(C_2O_4)\cdot 2{,}23 + 0{,}27\ H_2O \uparrow$$

$$Ca(C_2O_4)\cdot 2{,}23H_2O \rightarrow Ca(C_2O_4)\cdot 1{,}90 + 0{,}33\ H_2O \uparrow$$

$$Ca(C_2O_4)\cdot 1{,}9H_2O \rightarrow Ca(C_2O_4) + 1{,}90\ H_2O \uparrow$$

$$Ca(C_2O_4) \rightarrow CaCO_3 + CO \uparrow$$

$$CaCO_3 \rightarrow CaO + CO_2 \uparrow$$

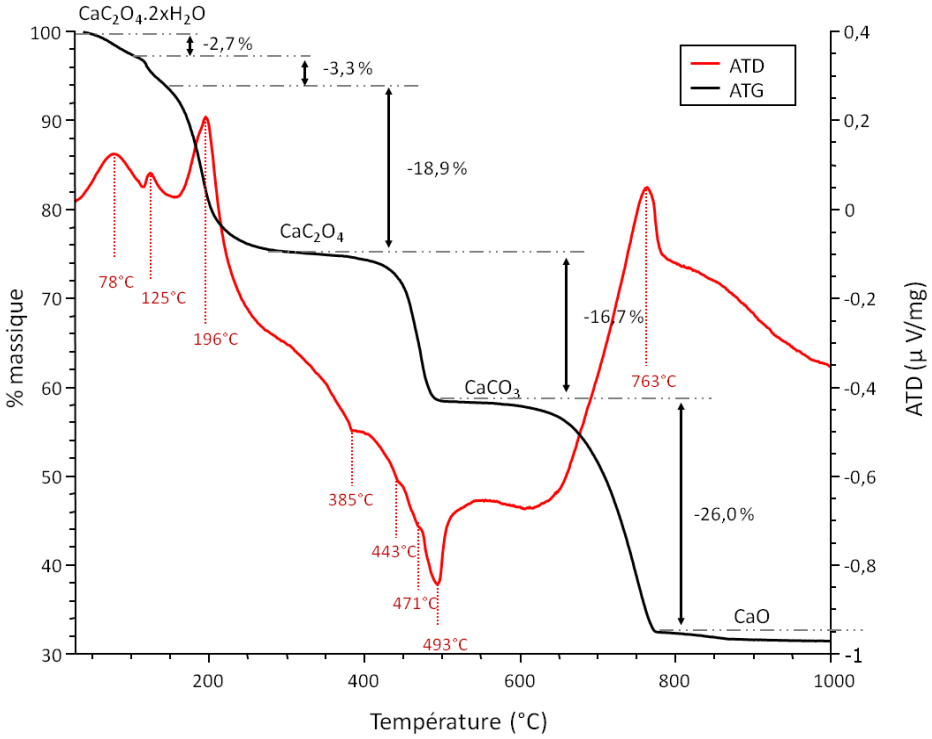



**Figure 1-15 : ATD/TG de la phase COD synthétique, 5°C/min sous flux d'air.**

On peut calculer le nombre de molécules d'eau grâce à la courbe de TG : on perd x molécules d'eau ce qui représente 24,9 % de la masse initiale. En partant du pourcentage massique de la phase finale (CaO représente 31,5 % massique et sa masse molaire est de 56,07 g/mol), on peut remonter au nombre de molécules d'eau :

$$x = \frac{M_{CaO} \times \%H_2O}{\%CaO \times M_{H_2O}} \qquad (1\text{-}1)$$

Par ce calcul, on obtient x = 2,5 molécules d'eau. Toutes les molécules d'eau ne sont bien évidemment pas équivalentes : on distingue des molécules d'eau adsorbées en surface, de l'eau zéolithique et de l'eau de structure. Il est à noter qu'avec la rampe de chauffe choisie, la phase COD se déshydrate directement en phase anhydre (COAnh) sans passer par la phase COM comme

intermédiaire. De la même manière qu'avec la phase COM, Frost *et coll.* ont analysé le COD en suivant la dégradation en température par spectroscopies Raman et FTIR [58].

- <u>COT</u>

Echigo *et coll.* [12] étudient le COT par analyse thermique et proposent un schéma de dégradation complet. A la lumière de ces travaux, nous avons pu facilement analyser nos propres résultats (m = 11,616 mg) avec les pertes théoriques massiques :

$$Ca(C_2O_4)\cdot 3H_2O \rightarrow Ca(C_2O_4)\cdot H_2O + 2\ H_2O\uparrow$$
100 % 80,2 % 19,8 %

$$Ca(C_2O_4)\cdot H_2O \rightarrow Ca(C_2O_4) + H_2O\uparrow$$
80,2 % 70,3 % 9,9 %

$$Ca(C_2O_4) \rightarrow CaCO_3 + CO\uparrow$$
70,3 % 54,9 % 15,4 %

$$CaCO_3 \rightarrow CaO + CO_2\uparrow$$
54,9 % 30,8 % 24,1 %

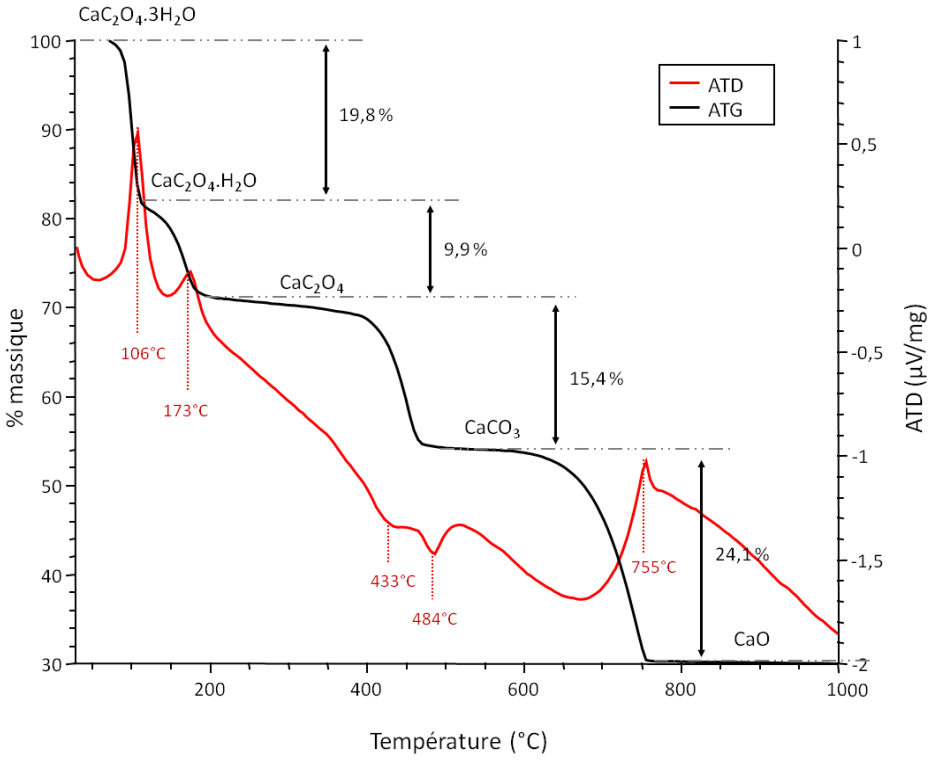



**Figure 1-16 : ATD/TG de la phase COT synthétique, 5°C/min sous flux d'air.**

On remarque que le COT se déshydrate directement en COM. Les pertes en pourcentage massique correspondent exactement aux valeurs théoriques et à celles obtenues par Echigo *et coll.* [12]. Néanmoins, l'ATD publiée diffère de la nôtre : cela s'explique par la différence de rampe de chauffe (2,0°C.min$^{-1}$ dans la publication).

On peut noter le travail de Hochrein *et coll.* [9] concernant la phase d'oxalate de calcium anhydre. Ces auteurs montrent qu'il existe trois polymorphes de la phase anhydre ; α-, β-, γ-$CaC_2O_4$. Ces résultats sont assez controversés et laissent planer des doutes quant à la structure de cette phase. Sur nos courbes ATD/TG des trois hydrates, on peut distinguer la présence de ces 3 types d'oxalates

de calcium anhydres. Entre 390 et 490°C, on remarque de légers signaux preuves de l'existence (éphémère) de ces phases sur les ATD (courbes rouges) des trois phases.

Les analyses thermiques sont particulièrement pertinentes lorsqu'elles sont couplées à d'autres méthodes d'analyses. Le suivi de la décomposition d'une phase apporte de nouvelles informations sur les réarrangements structuraux en temps réel. Frost *et coll.* proposent ainsi un couplage ATD/TG-Raman pour l'étude de la whewellite [52] et la weddellite [58], ils ont pu obtenir une meilleure compréhension des bandes de vibrations du COD, ainsi qu'une validation du modèle de dégradation à haute température. De la même manière, Christy *et coll.* [59] ont réalisé un travail sur l'analyse ATD/TG-FTIR permettant de visualiser la déshydratation du COM. Ces analyses nous ont permis de fixer une température de déshydratation du COM (190°C) afin d'obtenir de l'oxalate de calcium anhydre.

### *v. Microscopie électronique à balayage (MEB)*

La microscopie électronique à balayage permet d'observer la morphologie des cristaux formés. Il est à noter que pour certains échantillons isolants, une métallisation est nécessaire (environ 20 nm d'or). C'est le cas pour les oxalates de calcium. Les cristaux synthétisés étant relativement « gros » (~ > 5 µm), la métallisation ne gêne pas l'observation globale des surfaces. Nous nous focaliserons dans cette section sur les phases directement synthétisées, sans ajout de molécules chélatantes (voir discussion Chapitre 5 partie 1).

Le MEB peut également être couplé à une analyse dispersive en énergie (EDS) qui permet de connaitre la composition élémentaire des cristaux observés. Malheureusement, cette technique n'a pas pu être utilisée ici car le faisceau incident d'électrons détériore systématiquement les phases d'oxalate de calcium étudiées.

- COM

La whewellite est facilement synthétisée. Elle présente plusieurs morphologies différentes selon les conditions de synthèses mises en œuvre. La littérature montre majoritairement l'obtention de la morphologie dite en « pince à linge » [60]. Il nous a été donné d'observer d'autres morphologies au cours de cette thèse (voir Figure 1-17 et Figure 1-18). Millan *et coll.* proposent également différentes morphologies dans leur article de 2001 [25].

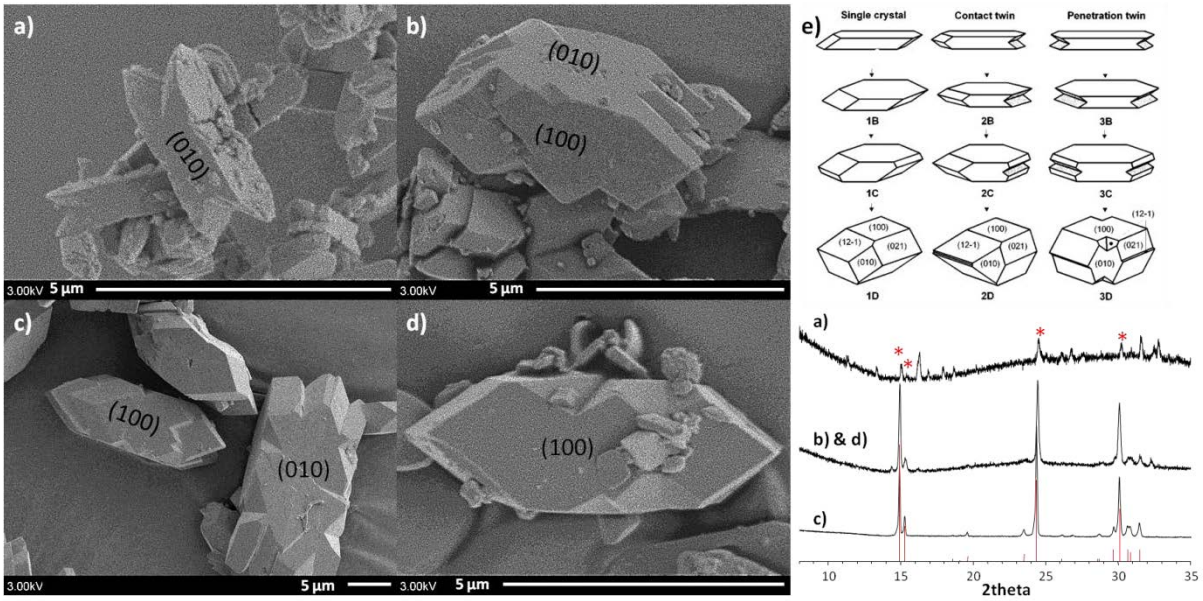



**Figure 1-17 : Images MEB du COM et DRX a) Synthèse en excès d'oxalates (1/10), à $T_{amb}$ et $[Ca_2^+]$ = 0,001 M, les ions calcium étant ajoutés aux ions oxalates. La DRX montre la présence d'une phase secondaire, * représente les pics de diffraction de la phase COM, fiche JCPDS : 20-0231. b & d) Synthèse identique mais ajout brutal d'une solution dans l'autre avec vieillissement de 16 heures c) Synthèse équimolaire, à $T_{amb}$ et $[Ca_2^+]$ = 0,010 M avec vieillissement de 12 jours. e) Schéma de l'évolution de trois morphologies différentes de COM d'après** [25].

Sur la Figure 1-17, on peut remarquer la morphologie en « pince à linge » du COM, différentes tailles de cristaux pouvant être obtenues en fonction des conditions de synthèse (de 2 à 30 µm). Les morphologies des cristaux ressemblent fortement à ce qu'ont pu observer Millan *et coll.* [25] (Figure 1-17e). Les diffractogrammes prouvent que cette phase est bien du COM. Cependant, la phase majoritaire présente en Figure 1-17a est celle de COT (voir le diffractogramme associé).

Bien que la Figure 1-17 présente la morphologie de la whewellite la plus commune, d'autres formes ont été obtenues par modification des conditions de synthèse en goutte à goutte (voir Figure 1-18). L'influence de l'agitation sur le système est bien mise en évidence. On peut néanmoins noter que cette forme caractéristique en « X » semble être un agglomérat des cristaux en « épingles » vus précédemment. Les diffractogrammes de ces échantillons montrent que nous sommes bien en présence de la phase COM. La Figure 1-18d montre la morphologie de COM obtenue lors des synthèses fortement concentrées (($[C_{réactifs}]$ = 0,100 M).

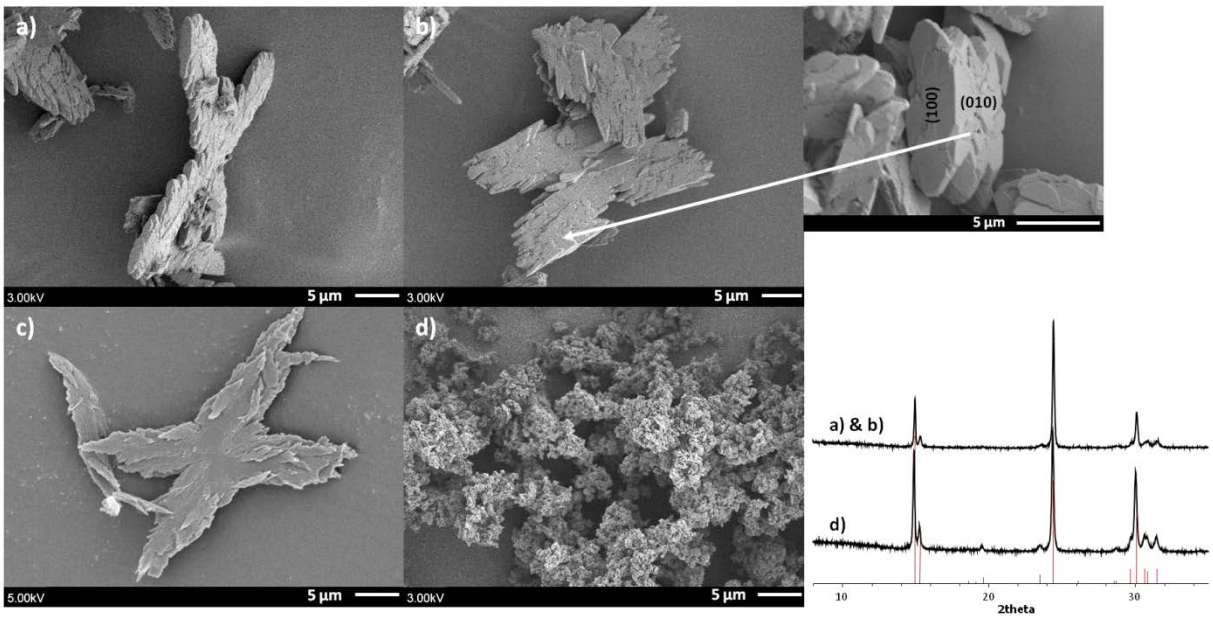



**Figure 1-18 : Images MEB de COM et DRX a) b) c) Synthèse équimolaire *sans agitation*, à $T_{amb}$ et [$Ca_2^+$] = 0,010 M avec vieillissement de 1 mois d) Synthèse équimolaire, à T < 4°C et [$Ca_2^+$] = 0,100 M.**

Les morphologies obtenues au cours de ces synthèses diffèrent des simulations proposées par Franchini-Angela *et coll.* [61].

- COD

Comme explicité précédemment, la weddellite a une structure zéolithique et possède un certain nombre de molécules d'eau dans des canaux. La morphologie traditionnellement est une bipyramide à base carrée [62], [30]. Cependant, lors des synthèses avec des concentrations en réactifs élevées, aucune morphologie caractéristique n'a été obtenue (comme pour le COM à 0,1 M – Figure 1-18 d). L'ajout de certains additifs chélatants a permis de former des cristaux à morphologies bien définies (voir Figure 1-19).

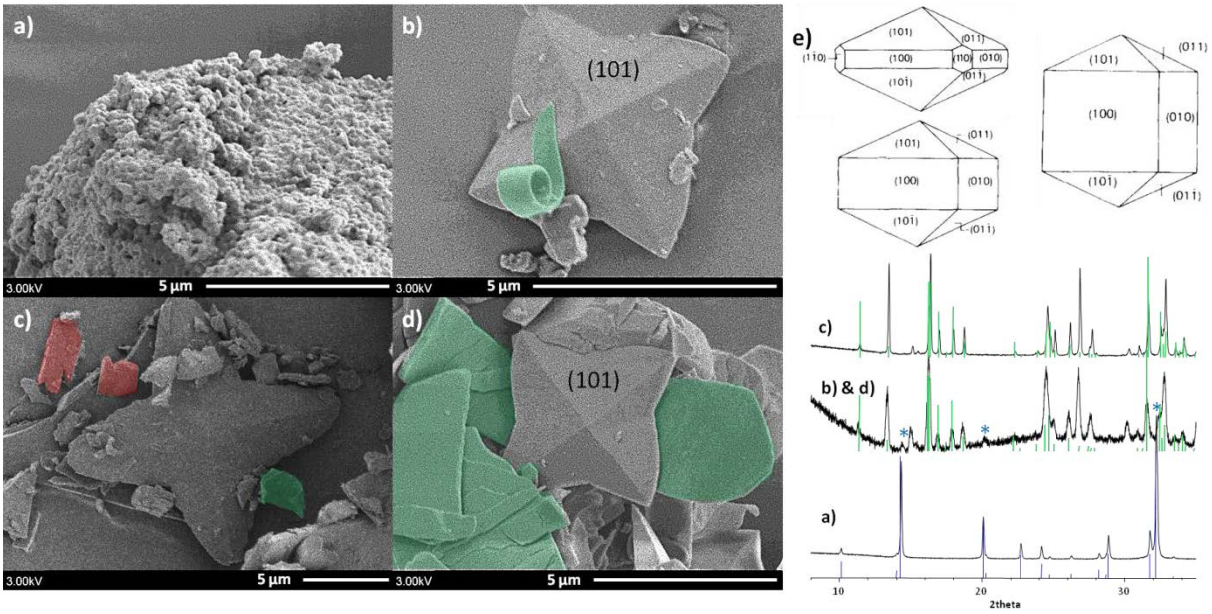



**Figure 1-19 : Images MEB du COD a) Synthèse en excès d'ions calcium (10/1), à T < 4°C et [$Ca^{2+}$] = 1,000 M, les ions oxalates étant ajoutés dans les ions calcium. b & d) Synthèse en excès d'ions oxalates (1/10) à $T_{amb}$ et [$Ca^{2+}$] = 0,001 M par ajout brutal d'une solution dans l'autre. c) Synthèse équimolaire à $T_{amb}$ et [$Ca^{2+}$] = 0,010 M et e) Modélisation de différentes morphologies possibles pour le COD d'après** [62]**. Les cristaux colorés en vert correspondent au COT et ceux en rouge au COM. Les diffractogrammes des trois échantillons sont présentés avec les fiches JCPDS du COD (bleu) et de COT (vert). Les * sur le diffractogramme b) & d) représentent la phase COD.**

La phase de COD synthétisée sans ajout est présentée sur la Figure 1-19a. Aucune morphologie typique de cette phase n'est observée. Des cristaux de COD avec des morphologies caractéristiques ont cependant pu être détectés lors de synthèses à faible concentration ([$Ca^{2+}$] = 0,010 M ou 0,001 M). Malgré cela, les faces (101) de ces cristaux ne sont pas strictement triangulaires ce qui amène à une morphologie en « étoile » plutôt que pyramidale. Les diffractogrammes présentés sur la Figure 1-19 attestent également du faible taux de ces cristaux de COD en « étoile » dans la totalité de l'échantillon (la phase majoritaire étant le COT, fiche JCPDS en vert). On peut noter que la face (100) (Figure 1-19e) n'est pas souvent observée dans ce type de synthèse. La morphologie la plus courante (bipyramide à base carrée) a été obtenue lors d'ajouts tels que les ions citrates ou de l'extrait de thé vert (les catéchines du thé pouvant jouer le rôle de molécules chélatantes des ions calcium), à différentes concentrations (Chapitre 5 partie 1 c).).

- <u>COT</u>

Pour mémoire, l'oxalate de calcium trihydraté est la phase la moins présente dans les calculs rénaux. Il s'agit d'une phase métastable qui peut être formée assez facilement à faible concentration de [$Ca^{2+}$] (0,010 à 0,001 M), et sous agitation forte. La morphologie du COT est très particulière, en feuillets. Grâce à cette morphologie, sa présence est aisément mise en évidence par MEB. Il y a relativement peu d'article dans la littérature relatifs aux différentes morphologies que peut adopter la phase de COT [18], [63].

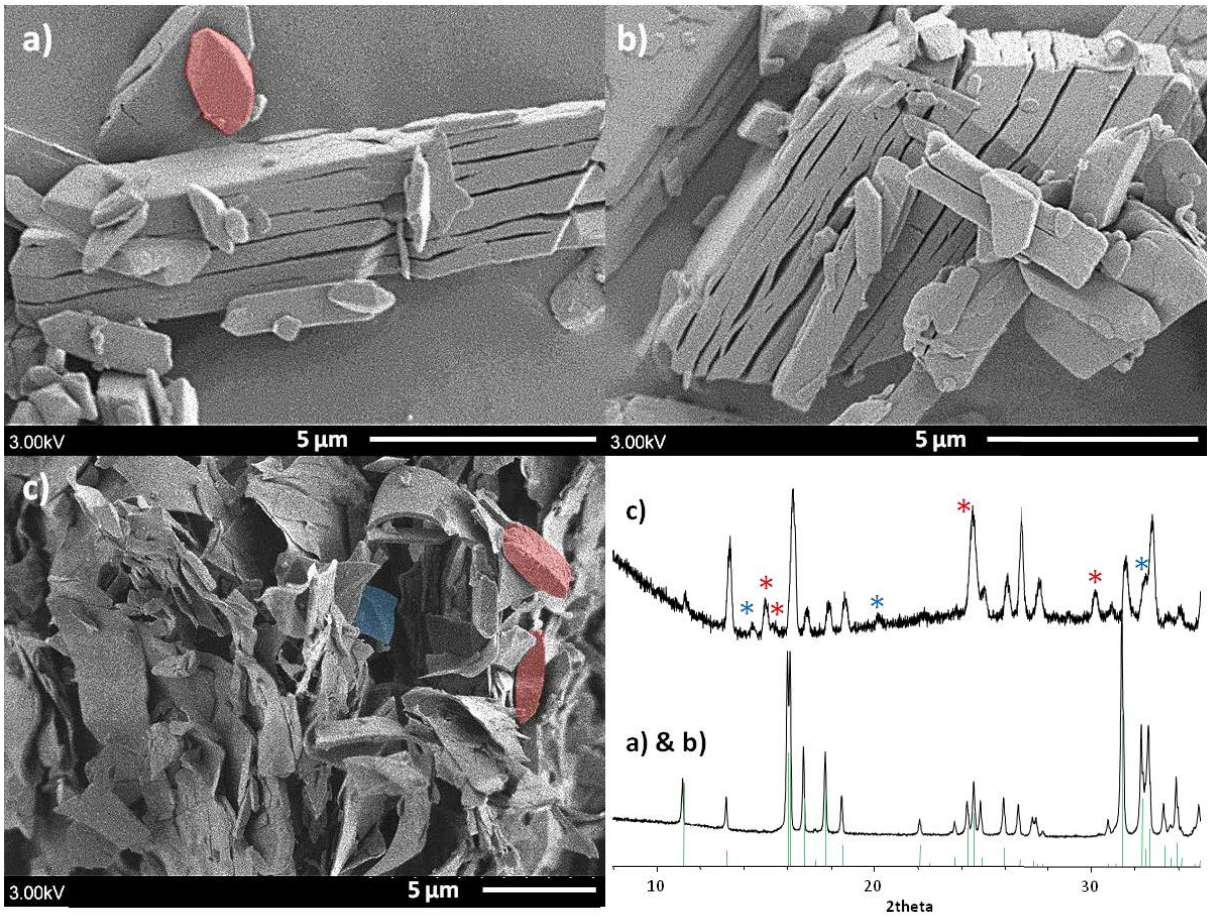



**Figure 1-20 : Images MEB du COT a & b) Synthèse équimolaire à T < 4°C et $[Ca^{2+}]$ = 0,001 M. c) Synthèse en excès d'ions oxalates (1/10) à $T_{amb}$ et $[Ca^{2+}]$ = 0,001 M par ajout brutal d'une solution dans l'autre. Les cristaux colorés en rouge et en bleu correspondent respectivement aux COM et COD. Les diffractogrammes des deux échantillons sont présentés ici avec la fiche JCPDS du COT (les astérisques rouge et bleue correspondent aux COM et COD, respectivement).**

Deux types de morphologies étroitement liés sont observés sur la Figure 1-20. Les images a) et b) montrent un empilement de plaquettes (ou lamelles) tandis que l'image c) présente des feuillets désolidarisés les uns des autres. Aucune autre morphologie n'a été observée pour cette phase. On peut noter l'apparition des phases COM (en rouge) et COD (en bleu) sur la Figure 1-20c. Le diffractogramme de l'échantillon permet également de valider leur présence. Le faible rapport signal/bruit est dû ici à la faible masse de produit récupérée (~ 5 mg).

Dans cette partie, nous avons présenté les différents oxalates de calcium hydratés qui sont au cœur de ce sujet de thèse. Leurs caractéristiques spectroscopiques et structurales ont été évoquées. Les différentes synthèses mises en œuvre lors de nos travaux ont permis d'obtenir des phases pures qui ont par la suite été analysées à l'aide de différentes techniques : spectroscopies FTIR et Raman, DRX, ATD/TG et MEB. La combinaison de toutes ces techniques d'analyses est nécessaire afin de connaître tous les aspects des composés synthétisés. Dans la suite de ce manuscrit (Chapitre 3 et 4), nous proposons d'utiliser une autre technique qui peut être considérée comme complémentaire des précédentes ; la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en phase solide. Cette technique spectroscopique permet de sonder un type donné de noyau ($^{1}H$, $^{13}C$, $^{43}Ca$) tout en conservant des informations sur la structure à plus longue distance du matériau considéré (ordre local et ordre à moyenne distance).

## 2. Apatite et apatites substituées

Une partie importante des travaux de cette thèse concerne également l'hydroxyapatite (HAp), de formule stœchiométrique $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Il s'agit d'un phosphate de calcium largement étudié dans le domaine de la biominéralisation [64]. En effet, il s'agit d'un biominéral majoritaire dans les tissus osseux, les dents, *etc*. Ce minéral est également présent dans certains calculs rénaux, d'où son étude ici [65]. A la surface des papilles rénales, un dépôt particulier (appelé plaque de Randall) sert parfois de noyau pour la croissance de l'oxalate de calcium. Celui-ci est composé principalement de phosphate de calcium apatitique comme expliqué dans l'Introduction. Dans ce cas, l'apatite considérée est partiellement substituée (en particulier par des ions carbonates).

### a) Structures hexagonale et monoclinique

Extrêmement étudiées, les apatites substituées sont des composés fascinants de par leur présence chez les mammifères mais également de par certaines de leurs propriétés ; l'hydroxyapatite peut être utilisée pour capturer et immobiliser des métaux lourds (comme le plomb ou le cadmium) [66], [67], ou en tant que support de catalyseur [68]. Elle présente la plupart du temps une structure cristalline hexagonale, mais il est possible de la trouver sous forme monoclinique. Comme nous le verrons ci-après, les structures se composent d'un réseau de tétraèdres $PO_4^{2-}$ (orthophosphates) maintenus par des ions $Ca^{2+}$ intercalés entre eux. *Stricto sensu*, le terme apatite désigne trois minéraux : l'hydroxyapatite, ou HAp, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, la chloroapatite, $Ca_{10}(PO_4)_6Cl_2$ et la fluoroapatite, $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$. Toutes ces structures sont caractérisées par Z = 2 et le groupe d'espace **$P6_3/m$**. Les arrangements atomiques de ces trois structures se différencient principalement par les positions [0 0 z] des entités anioniques ($OH^-$, $Cl^-$, $F^-$, respectivement). On notera la présence de deux sites calcium, Ca1, Ca2, un site de phosphore, P, et trois sites d'oxygène O1, O2, O3. Pour HAp, les paramètres de maille sont : a = 9,417(2) Å, c = 6,875(2) Å. Les positions de P et O1, O2, O3 sont quasiment superposables dans les trois structures décrites ci-dessus. L'atome central, P, est en position spéciale *6h*. L'atome Ca1 présente une coordinence de 9 (position 4f) (9 liaisons Ca–O). Ce polyèdre est peu sensible à la nature de l'anion $OH^-$, $Cl^-$ ou $F^-$. Ce n'est plus le cas pour l'atome Ca2 qui présente quant à lui une coordinence de 7 (6 liaisons Ca–O et 1 liaison Ca–X avec X = $OH^-$, $Cl^-$ ou $F^-$). Les cations Ca2 forment des triangles dans les plans z = ¼ et z = ¾ et l'anion considéré est en position [0 0 z] dans la colonne. Dans le cas de $F^-$, z = ¼. Les anions $OH^-$ et $Cl^-$ sont beaucoup plus volumineux : il en résulte que z ≠ ¼. Un tel déplacement dans les colonnes conduit à la suppression du plan miroir situé à z = ¼ et à la perte (au moins locale) de la symétrie **$P6_3/m$**: en effet, seule une des deux positions (au dessus et en dessous du plan miroir) peut être effectivement occupée. Néanmoins, et à de rares exceptions près (voir ci-dessus), le cristal est considéré dans son ensemble : chaque site relié au miroir est occupé à 50 % et la symétrie **$P6_3/m$** est globalement conservée. Bien entendu, il est tout à fait possible de s'intéresser plus précisément à l'ordre local au niveau des colonnes anioniques ($OH^-$, $Cl^-$ ou $F^-$). Si l'on suppose un ordre régulier (en-dessus ou en-dessous du plan miroir) dans une colonne donnée, alors le réarrangement des polyèdres concernés implique un ordre inverse (en dessous ou en dessus du plan miroir) d'une colonne adjacente le long de l'axe b. Il en résulte un abaissement de la symétrie de la structure : **$P6_3/m \rightarrow P2_1/b$** (symétrie monoclinique voir Figure 1-21 et Tableau 1-10). Elliott a décrit cette structure dans plusieurs articles, dont un en 1973 [69], dans lequel il donne une description des paramètres cristallins et décrit la synthèse à partir de chloroapatite. Ces paramètres seront repris en 2002 par Suetsugu [70], tout en

permettant une meilleur détermination des positions des groupements $OH^-$. La Figure 1-21 reprend les paramètres de ce dernier travail. Sur cette dernière on remarque les colonnes d'$OH^-$ présentant des directions O → H inversées entre colonnes adjacentes.

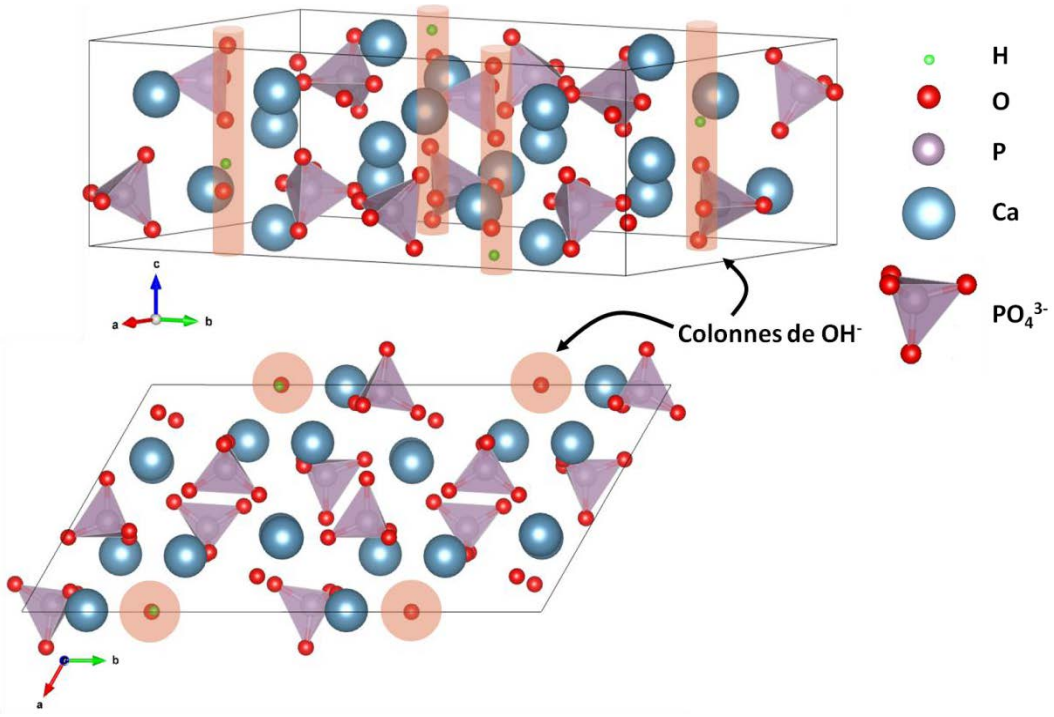



Figure 1-21 : Structure cristalline de l'hydroxyapatite stœchiométrique monoclinique [70].

Tableau 1-10 : Paramètres de maille et coordonnées atomiques de l'hydroxyapatite, monoclinique d'après [70].

| Paramètres de maille | γ (°) | a (Å) | b (Å) | c (Å) |
|---|---|---|---|---|
| | 119,980 | 9,424 | 9,424 | 6,879 |
| **Atome** | | **x** | **y** | **z** |
| **O(1)** | | 0,48420 | 0,32788 | 0,75830 |
| **O(2)** | | 0,15670 | 0,58605 | 0,24650 |
| **O(3)** | | 0,32780 | 0,49213 | 0,25920 |
| **O(4)** | | 0,53450 | 0,31112 | 0,24370 |
| **O(5)** | | 0,12200 | 0,54334 | 0,73340 |
| **O(6)** | | 0,58630 | 0,48253 | 0,23770 |
| **O(7)** | | 0,74650 | 0,29076 | 0,07850 |
| **O(8)** | | 0,07920 | 0,41302 | 0,58200 |
| **O(9)** | | 0,32780 | 0,37519 | 0,08200 |
| **O(10)** | | 0,73760 | 0,29506 | 0,43760 |
| **O(11)** | | 0,08930 | 0,42890 | 0,94010 |
| **O(12)** | | 0,35650 | 0,38223 | 0,43990 |
| **O(13)** | | 0,99970 | 0,25007 | 0,30340 |
| **P(1)** | | 0,63125 | 0,26521 | 0,25469 |
| **P(2)** | | 0,02971 | 0,44896 | 0,75148 |
| **P(3)** | | 0,39787 | 0,43419 | 0,25468 |
| **Ca(1)** | | 0,32641 | 0,58033 | 0,00081 |
| **Ca(2)** | | 0,34044 | 0,58694 | 0,49779 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Ca(3)** | 0,24599 | 0,24649 | 0,25293 |
| **Ca(4)** | 0,99330 | 0,62305 | 0,74424 |
| **Ca(5)** | 0,25397 | 0,37346 | 0,75590 |
| **H(1)** | 0,99500 | 0,25300 | 0,43700 |

Notons que dans le cas des HAp naturelles, des impuretés (ou des lacunes) sont systématiquement présentes ce qui tend à détruire l'ordre des anions dans les colonnes ; Il en résulte le groupe d'espace **$P6_3/m$** (hexagonal). Cette situation est très bien décrite par Sudarsanan et Young [71] dans le cas de l'HAp de type Hollysprings. Les auteurs démontrent que la structure est hexagonale et que ~ 8 % des groupements des hydroxyles sont remplacés par des fluorures. La Figure 1-22 présente la structure hexagonale de l'hydroxyapatite telle que proposée par Sudarsanan en 1969 [71].

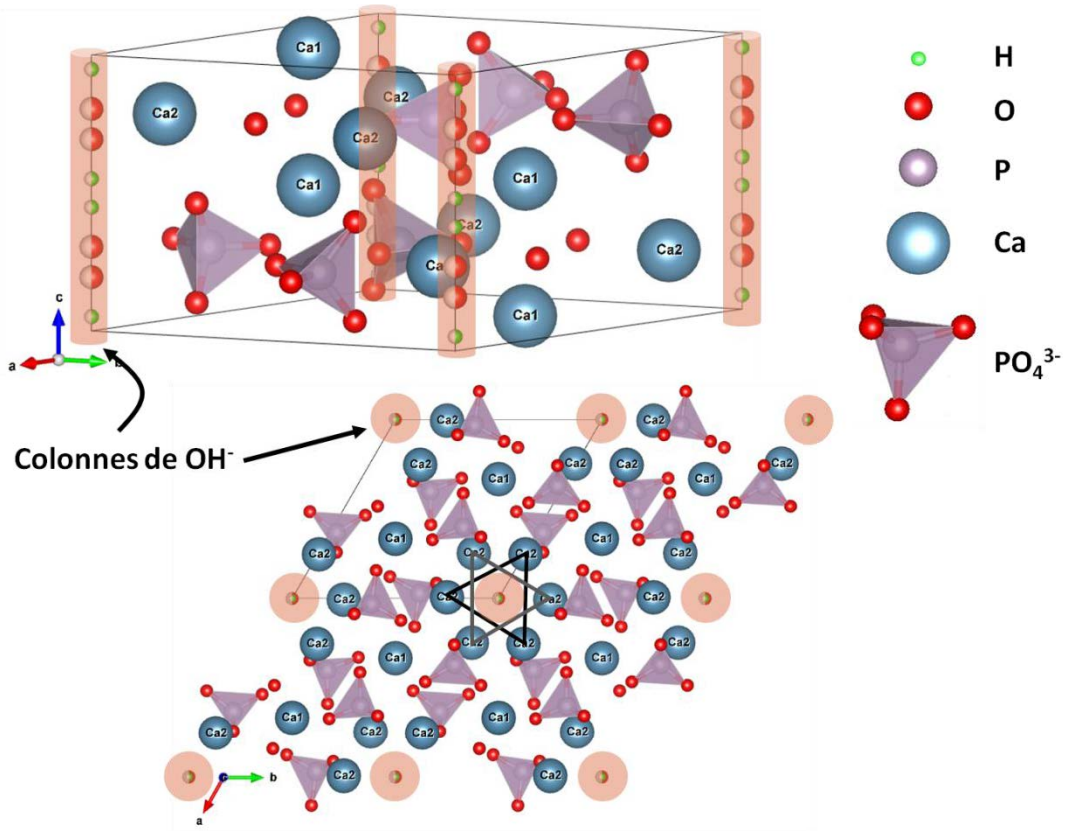



**Figure 1-22 : Structure cristalline de l'hydroxyapatite stœchiométrique hexagonale (le taux d'occupation < 1 est représenté par une demi-sphère). D'après Sudarsanan et Young [71].**

**Tableau 1-11 : Paramètres de maille et coordonnées atomiques de l'hydroxyapatite hexagonale, d'après [71].**

| **Paramètres de maille** | **γ (°)** | **a (Å)** | **b (Å)** | **c (Å)** |
|---|---|---|---|---|
| | 120 | 9,424 | 9,424 | 6,879 |
| **Atome** | **Occ.** | **x** | **y** | **z** |
| **O(1)** | 1,00000 | 0,32840 | 0,48480 | 0,25000 |
| **O(2)** | 1,00000 | 0,58730 | 0,46510 | 0,25000 |
| **O(3)** | 1,00000 | 0,34370 | 0,25790 | 0,07020 |
| **O(4)** | 0,50000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,19500 |
| **P(1)** | 1,00000 | 0,39870 | 0,36850 | 0,25000 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Ca(1)** | 1,00000 | 0,33333 | 0,66667 | 0,00150 |
| **Ca(2)** | 1,00000 | 0,24680 | 0,99340 | 0,25000 |
| **H(1)** | 0,50000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,06080 |

Les ions $Ca^{2+}$ se situent dans deux sites différents : dans des colonnes alignées avec précision (Ca1), et en triangles équilatéraux en noirs sur Figure 1-22 (Ca2). Les $OH^-$ se situent eux dans des colonnes : deux colonnes d'$OH^-$ accolées seront orientées dans les deux directions opposées. Comme expliqué précédemment, cette configuration implique qu'il y ait une interférence stérique entre des $OH^-$ adjacents dans les colonnes. Cette interaction est compensée par omission d'un groupe $OH^-$ ou par le remplacement d'un $OH^-$ avec un autre anion fluorure, chlorure, *etc.*

### b) Substitutions et rôle des carbonates

Comme nous l'avons évoqué lors de la description des deux structures cristallographiques de l'hydroxyapatite, des substitutions peuvent être présentes dans les échantillons naturels ou lors de synthèses avec ajout d'anions et/ou de cations. Ces substitutions peuvent être obtenues volontairement ou résultent d'une pollution de l'échantillon (par exemple des carbonates présents en solution aqueuse). Il existe deux types de substitutions au sein de la maille cristalline dépendant de l'espèce substituée ; les substitutions en ***site A*** ou en ***site B***.

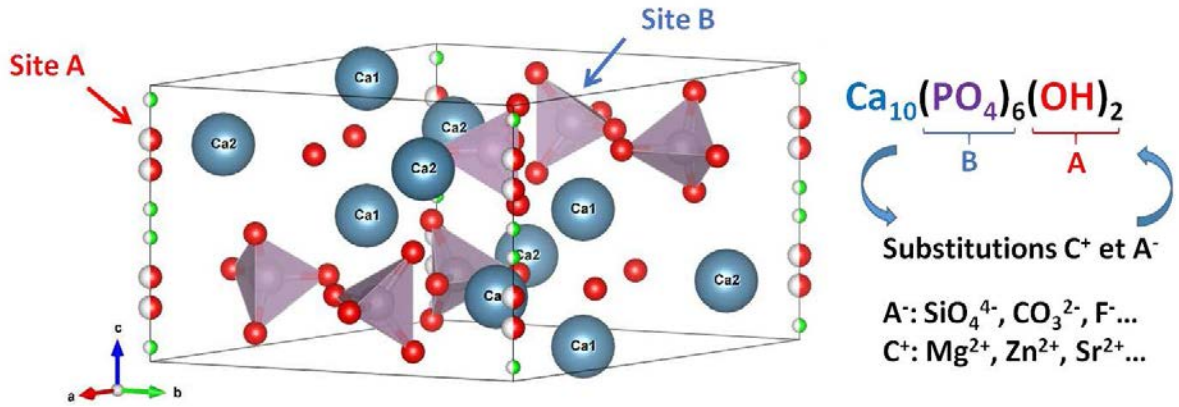



**Figure 1-23 : Substitutions anioniques et cationiques possibles en sites A et/ou B de l'hydroxyapatite stœchiométrique (ici hexagonale).**

La Figure 1-23 rappelle la structure hexagonale de l'hydroxyapatite et les deux types de substitutions ioniques possibles. Les sites A concernent les groupements hydroxyles et sont donc situés dans les colonnes présentées ci-dessus ; les sites B quant à eux concernent les groupements phosphates. Il a été montré que la bioactivité des apatites est notamment due à ces nombreuses substitutions possibles [72].

La dentine, recouverte par l'émail des dents est composée à plus de 70 % d'hydroxyapatite. L'émail dentaire est également principalement formé d'hydroxyapatite. On retrouve dans ces matériaux un grand nombre de substitutions ioniques, chaque type d'ion leurs donnant des propriétés différentes. Par exemple, des ions fluorures sont présents et permettent la prolifération d'ostéoblastes (cellules permettant la minéralisation de la matrice non-minérale) et inhibent l'activité des ostéoclastes (cellules participant à la résorption du tissu osseux) [73]. La présence d'ions magnésium joue un rôle

dans la dureté de la matrice osseuse ainsi que dans le développement des caries de l'émail dentaire [74]. En ce qui concerne l'os, les ions carbonates sont présents dans les deux sites de substitution A et B. Leur présence permet d'augmenter la concentration locale de calcium et de phosphate pour la formation d'os nouveau [75], d'accroitre la solubilité du minéral [76] : en d'autres termes, l'apatite carbonatée (CHAp, *i.e.* hydroxyapatite avec des substitutions par des ions carbonates) est « plus proche » du minéral de l'os que l'hydroxyapatite stœchiométrique [77], [78]. Afin d'augmenter la bioactivité de l'apatite (par exemple pour la reconstruction osseuse), il est possible également d'y incorporer des silicates [79], [80]. Pietak *et coll.* évoquent la présence de traces de silicates au cours des stades précoces de la biominéralisation de l'os et montrent l'augmentation de l'activité biologique des hydroxyapatites silicatées [81].

D'autres types de substitutions ont pu être effectuées, notamment avec le plomb et le vanadium [82]. Ces deux ions sont connus pour modifier les propriétés redox et catalytiques de l'HAp. Ces deux cations peuvent se substituer à des ions calciums (Ca1 et Ca2), générant ainsi un désordre structural. D'autres types de substitutions cationiques sont reportés dans la littérature comme par exemple par des ions strontium ou baryum [83].

### c) Synthèses mises en œuvre

Nous avons synthétisé l'hydroxyapatite par deux voies de synthèses différentes ; ***(i)*** par précipitation par goutte à goutte (voir ci-dessus la synthèse des oxalates de calcium), ***(ii)*** en bombe hydrothermale (autoclave). Chacune de ces synthèses respecte le ratio calcium/phosphates de 1,67 nécessaire afin de synthétiser de l'hydroxyapatite stœchiométrique. La synthèse de l'hydroxyapatite a pour but ici d'imiter la plaque de Randall, cette dernière présente une surface relativement plane permettant la croissance hétérogène de l'oxalate de calcium.

#### *i. Précipitation par goutte à goutte*

Cette technique de synthèse, également appelée « par voie humide », est une synthèse d'hydroxyapatite déjà largement répandue [84]. De la même manière que pour la synthèse des oxalates de calcium, elle consiste à mélanger deux solutions aqueuses contenant pour l'une, le précurseur de calcium, et pour l'autre le précurseur de phosphate. Comme dans la synthèse de Takemoto *et coll.*, nous avons utilisé $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ou $CaCl_2$ comme précurseurs de calcium et $(NH_4)_2HPO_4$ comme précurseur de phosphates. Plusieurs paramètres peuvent être adaptés lors de cette synthèse, comme le pH, le débit du goutte à goutte, la température, *etc*. Cette synthèse étant réalisée en atmosphère non contrôlée, il y a naturellement un risque de substitution par des carbonates. Néanmoins, nous avons effectué des substitutions par des ions carbonates et sodium par ajout d'un réactif extérieur ($NaHCO_3$ ou NaCl), pour mimer au mieux les apatites biologiques. Comme nous le verrons par la suite, l'enrichissement des carbonates en $^{13}C$ peut être effectué en utilisant $NaH^{13}\underline{C}O_3$.

Il est donc important d'être rigoureux en termes de pH et du rapport Ca/P afin d'obtenir une phase pure d'apatite : le rapport Ca/P est le paramètre le plus fondamental. S'il est différent de cette valeur, d'autres phases sont susceptibles d'être formées (Tableau 1-12).

Tableau 1-12 : Principaux phosphates de calcium.

| Nom | | Formule | Rapport Ca/P |
|---|---|---|---|
| **Phosphate monocalcique monohydrate ou anhydre** | MCPM<br>MCPA | $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$<br>$Ca(H_2PO_4)_2$ | 0,5 |
| **Monetite**<br>**Brushite** | DCP<br>DCPD | $CaHPO_4$<br>$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ | 1 |
| **Phosphate octacalcique** | OCP | $Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$ | 1,33 |
| **Phosphate tricalcique** | TCP | $Ca_3(PO_4)_2$ | 1,5 |
| **Hydroxyapatite** | Hap | $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ | 1,67 |
| **Phosphate tetracalcique** | TTCP | $Ca_4(PO_4)_2O$ | 2 |

Deux solutions, contenant chacune un précurseur, sont préparées : $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (ou $CaCl_2$) à 0,500 M et $(NH_4)_2HPO_4$ à 0,003 M dans de l'eau distillée. Lorsque des échantillons substitués sont préparés, 3 équivalents de $NaHCO_3$ ou 6 équivalents de NaCl sont ajoutés à la solution de phosphates. Le pH de la solution de phosphates est ajusté à 10 grâce à une solution d'ammoniac. Cette solution est ajoutée à celle de calcium (goutte à goutte) sous agitation magnétique. La solution est laissée sous agitation pendant 24 heures puis le précipité formé est récupéré par centrifugation et lavé plusieurs fois à l'eau distillée. Ce dernier est ensuite placé une nuit à l'étuve (100°C) pour être séché puis broyé. La poudre récupérée est ensuite traitée thermiquement entre 450 et 550°C dans un four à moufle.

#### *ii. Synthèse en autoclave*

Nous présentons ici un autre type de synthèse s'appuyant sur le protocole précédent. Après l'ajout goutte à goutte des deux solutions contenant les deux précurseurs de calcium et de phosphates, la solution finale est placée dans une bombe hydrothermale (autoclave à pression autogène). Celle-ci est mise à l'étuve à 180°C pendant 24h. Puis la solution est centrifugée, lavée à l'eau et séchée. Le précurseur de calcium $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ est remplacé ici par du $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, un précurseur ne contenant pas de nitrates, qui peuvent être explosifs à haute température. De la même manière que précédemment, un traitement thermique (entre 450 et 550°C) a été appliqué aux poudres ainsi obtenues.

Ces deux types de synthèses conduisent à des tailles et des morphologies de cristaux d'apatites variées. Les résultats sont explicités dans la partie suivante.

### d) Méthodes de caractérisation

#### *i. FTIR, une sonde à carbonates*

La spectroscopie FTIR est particulièrement utile pour pouvoir détecter les substitutions par des carbonates [85]. La spectroscopie IR permet de différentier les deux types de substitutions (en sites A ou B). Le spectre de la phase pure d'HAp synthétisée est présenté sur la Figure 1-24 (en noir).

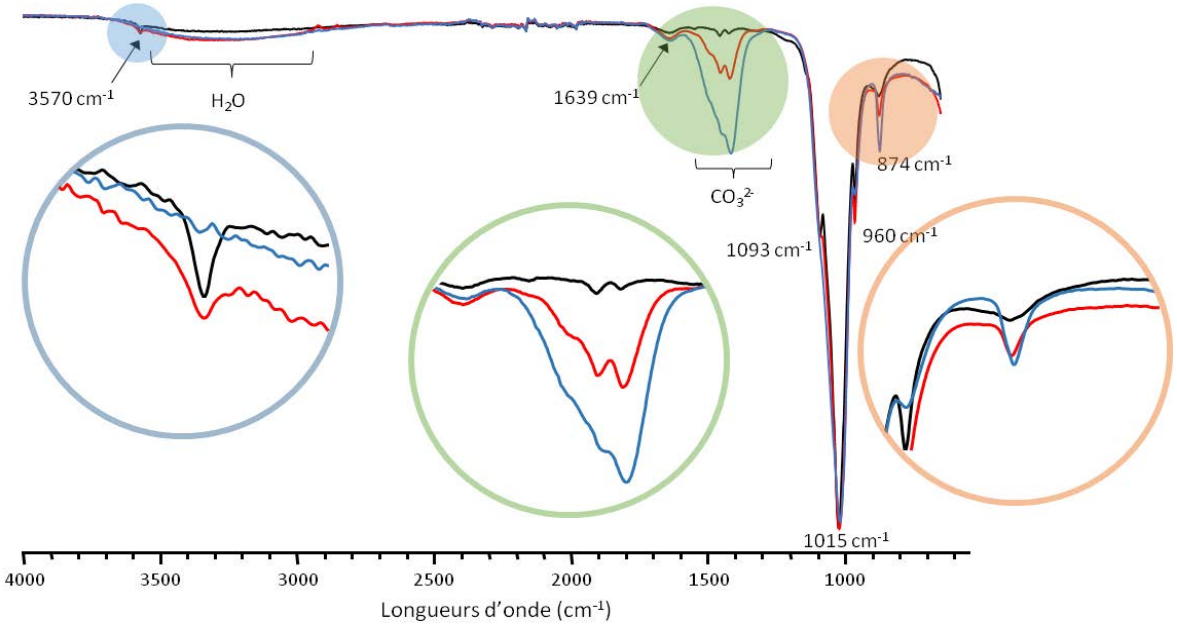



**Figure 1-24 : Spectres FTIR (ATR) d'hydroxyapatites synthétiques. HAp (en noir) laissée à l'air pendant 24 hrs, HAp carbonatée à l'air pendant 5 jours (en rouge), HAp carbonatée par $NaHCO_3$ (en bleu).**

Les deux autres spectres montrent la substitution partielle de l'HAp par des carbonates : substitution à l'air libre (en rouge) pendant 5 jours (sans précaution expérimentale particulière) et substitution par ajout du précurseur carbonaté $NaHCO_3$ (en bleu).

**Tableau 1-13 : Attributions des bandes de vibrations IR (en $cm^{-1}$) d'HAp synthétiques d'après** [86], [87] **et** [88].

| Apatite carbonatée | Attributions |
|---|---|
| **3570 vw** | Elongation sym $OH^-$ $\nu_{(OH-)}$ |
| **3530-2925 w, b** | Elongation O-H $\nu_{(OH)}$ |
| **1639 w, b** | Déformation $H_2O$ |
| **1495 sh** | Elongation antisym $\nu_{a(CO_3^{2-})}$ |
| **1456** | Elongation antisym $\nu_{a(CO_3^{2-})}$ |
| **1415** | Elongation antisym $\nu_{a(CO_3^{2-})}$ |
| **1093 s** | Elongation antisym $\nu_{a(PO_4^{3-})}$ |
| **1015 vs** | Elongation antisym $\nu_{a(PO_4^{3-})}$ |
| **960 s** | Elongation sym $\nu_{s(PO_4^{3-})}$ |
| **874 m** | Déformation en dehors du plan $CO_3^{2-}$ |

'v' pour *very*, 's' pour *strong*, 'm' pour *medium*, 'w' pour *weak*, 'b' pour *broad*, et 'sh' pour *shoulder*.

Le Tableau 1-13 donne les principales attributions. Les spectres sont nettement dominés par les bandes des ions phosphates (correspondant à l'élongation antisymétrique à 1015 $cm^{-1}$). On remarque par la présence de signaux correspondant aux carbonates que l'HAp n'est pas pure. Si aucune attention particulière n'est portée lors de la synthèse, des substitutions en carbonates apparaissent *via* le $CO_2$ de l'air et celui dissous dans l'eau. Les substitutions en $CO_3^{2-}$ s'observent sur le spectre principalement entre 1400 et 1600 $cm^{-1}$. Il est possible de différencier les types de substitutions (A ou B) par spectroscopie FTIR. Les signaux à 1415, 1456 et 1500 $cm^{-1}$ sont caractéristiques des substitutions en sites B, tandis que les signaux vers 1456 et 1549 $cm^{-1}$ sont caractéristiques des sites A [89], [90] et [85]. Les substitutions en sites A sont également accompagnées d'une diminution de l'intensité du signal a 3570 $cm^{-1}$ correspondant aux $OH^-$ des

colonnes. La zone vers 875 $cm^{-1}$ est aussi un moyen de différencier les substitutions de types A et B. La résolution des spectres ne permet pas une étude plus approfondie (*i.e.* déconvolution) de cette partie du spectre (900 – 820 $cm^{-1}$). La présence de sodium dans l'hydroxyapatite substituée modifie les valeurs des bandes de vibrations des carbonates. La présence de $Na^+$ dans la structure apatitique est clairement démontrée par le déplacement du doublet $\nu(CO_3^{2-})$ (élongations antisymétriques) des carbonates de type A dans la région normalement associée aux carbonates de type B. Par conséquent, un très fort chevauchement entre les bandes FTIR est observé (voir cercle vert Figure 1-24). Pour plus de détails sur cette problématique, le livre de Fleet [91] est une référence. Les spectres FTIR semblent montrer que les substitutions présentes dans les matériaux étudiés sont de type B majoritairement. Cependant le signal à 3570 $cm^{-1}$ diminue et la présence de sodium décale les signaux des sites A : nous pouvons supposer qu'il existe donc un certain pourcentage de substitutions de type A.

### *ii. La Diffraction des rayons X (DRX)*

La diffraction des rayons X permet également d'avoir une très bonne idée de la pureté des composés synthétisés tout en donnant des informations sur la taille moyenne des cristaux obtenus. Les différents traitements thermiques (450-550°C avant pastillage ou 1100°C après pastillage) effectués ont permis de modifier la cristallinité des HAp. Ces pastilles serviront de « copies » de la plaque de Randall pour des expériences décrites dans le Chapitre 5.

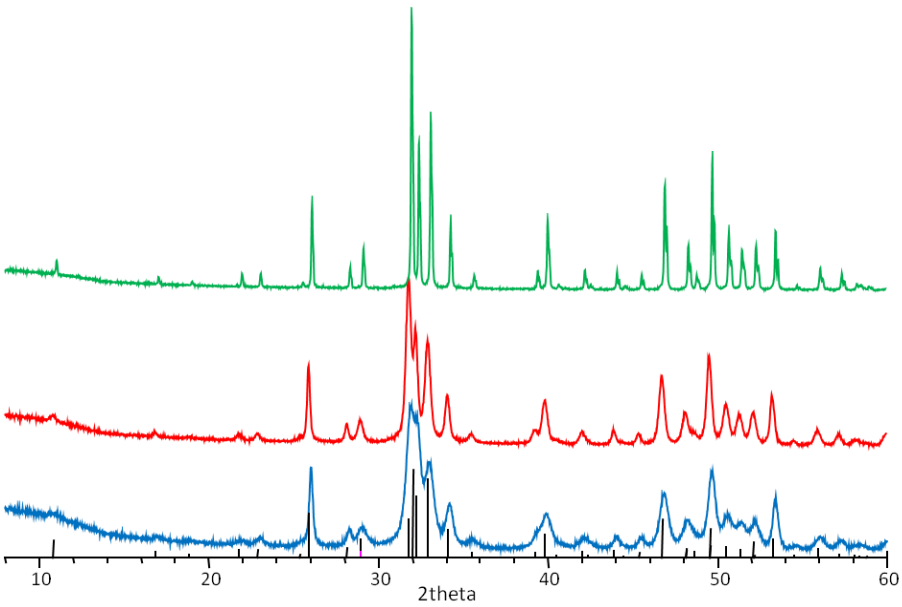



**Figure 1-25 : Diffractogrammes d'Hap traitées à différentes températures, à 100°C (en bleu), à 450°C (en rouge) et à 1100°C (en vert). En noir, la fiche JCPDS 9-432 (hexagonale).**

La Figure 1-25 montre que le traitement thermique est essentiel afin d'obtenir de l'HAp très cristallisée. Les pics de diffraction sont tous en accord avec les données JCPDS (9-432). A partir de ces diffractogrammes, il a été possible de calculer la taille moyenne des cristallites grâce à la formule de Scherrer :

$$L_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \qquad (1\text{-}2)$$

où K est le facteur de forme constant (K = 0,89), λ est la longueur d'onde de la source de rayons X (λ = 0,154 nm), θ est l'angle de diffraction et β est la largeur à mi-hauteur corrigée du pic de diffraction considéré :

$$\beta = \sqrt{\beta^2_{\text{mesuré}} - \beta^2_{\text{instrumental}}} \quad (1\text{-}3)$$

avec $\beta_{\text{instrumental}}$ = 0,03°
On obtient des tailles d'environ 25 nm pour une calcination à 100°C, ~ 44 nm à 450°C et ~ 330 nm à 1100°C. Le traitement thermique permet donc d'augmenter la taille moyenne des cristallites.

### *iii. Microscopies électronique en transmission (MET) et à balayage (MEB)*

La Figure 1-26 présente des images MET de deux échantillons d'hydroxyapatites obtenues par les deux types de synthèses décrites ci-dessus. Par voie humide (Figure 1-26a) les cristaux obtenus sont irréguliers et principalement sous forme de bâtonnets. La taille des grains varie de 10 à 50 nm en longueur, 10 nm en largeur. L'image en Figure 1-26b montre les nanocristaux obtenus en autoclave. Ils présentent une morphologie un peu plus homogène (également en bâtonnets ou « grains de riz »), allant de 20 à 100 nm.

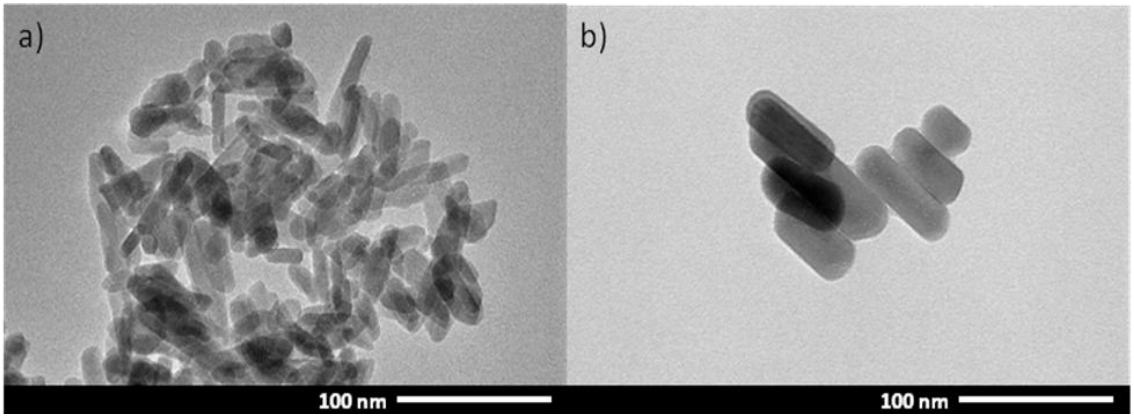



**Figure 1-26 : Images MET à échelle équivalente d'Hap synthétisée par goutte à goutte (a) et en autoclave (b).**

Après synthèse, les nanocristaux d'HAp sont traités thermiquement afin d'augmenter la taille des particules, voire effectuer un frittage et augmenter la cristallinité (comme démontré par DRX). Les traitements thermiques effectués vont de 450 à 1100°C. Le départ des ions carbonates s'effectue entre 600 et 800°C. Les poudres synthétisées ont été tout d'abord chauffées entre 450 et 550°C puis pastillées et finalement frittées à 1100°C (Figure 1-27).

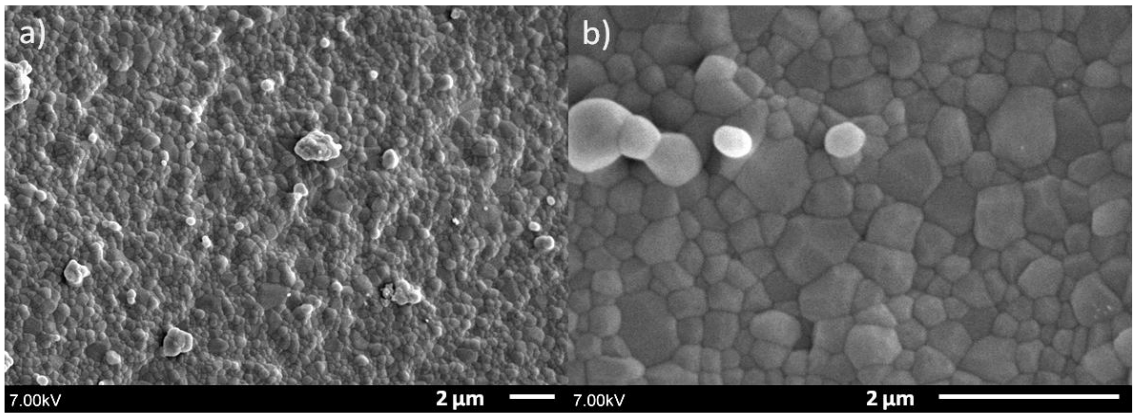



Figure 1-27 : Images MEB d'Hap après pastillage et frittage à 1100°C.

Une surface relativement plane est obtenue. Les cristallites ont désormais une morphologie polyédrique et peuvent atteindre une taille micrométrique. Une polydispersité en taille est clairement mise en évidence. Les hydroxyapatites carbonatées (synthétisées en présence de $NaHCO_3$) ont été analysées par analyses chimiques élémentaires.

## Bibliographie Chapitre 1 :


[1] M. Daudon, O. Traxer, and P. Jungers, *Lithiase Urinaire*, 2e édition. **2012**.

[2] F. Cioppi, L. Taddei, M. L. Brandi, and E. Croppi, "Idiopathic Hypercalciuria and Calcium Renal Stone Disease: Our Cases," *Clin. Cases Miner. Bone Metab.*, 6, 3, 251–253, **2009**.

[3] M. Daudon, O. Traxer, E. Lechevallier, and C. Saussine, "La Lithogenèse," *Progrès en Urol.*, 18, 12, 815–827, **2008**.

[4] B. Xie, T. J. Halter, B. M. Borah, and G. H. Nancollas, "Aggregation of Calcium Phosphate and Oxalate Phases in the Formation of Renal Stones," *Cryst. Growth Des.*, 15, 1, 204–211, **2015**.

[5] M. Daudon, "Épidémiologie Actuelle de la Lithiase Rénale en France," *Ann. Urol. (Paris).*, 39, 6, 209–231, **2005**.

[6] H. J. Arnott, F. G. Pautard, and H. Steinfink, "Structure of Calcium Oxalate Monohydrate," *Nature*, 208, 5016, 1197–1198, **1965**.

[7] W. Pecora and J. Kerr, "Whewellite from a Septarian Limestone Concretion in Marine Shale near Havre, Montana," *Am. Mineral.*, 39, 3–4, 208–214, **1954**.

[8] V. Tazzoli and C. Domeneghetti, "The Crystal Structures of Whewellite and Weddellite: Re-examination and Comparison," *Am. Mineral.*, 65, 327–334, **1980**.

[9] O. Hochrein, A. Thomas, and R. Kniep, "Revealing the Crystal Structure of Anhydrous Calcium Oxalate, $CaC_2O_4$, by a Combination of Atomistic Simulation and Rietveld Refinement," *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemie*, 634, 11, 1826–1829, **2008**.

[10] S. Deganello, "The Basic and Derivative Structures of Calcium Oxalate Monohydrate," *Zeitschrift fur Krist.*, 152, 247–252, **1980**.

[11] S. Deganello, "The Structure of Whewellite, $CaC_2O_4{\cdot}H_2O$ at 328 K," *Acta Crystallogr.*, B37, 826–829, **1981**.

[12] T. Echigo, M. Kimata, A. Kyono, M. Shimizu, and T. Hatta, "Re-investigation of the Crystal Structure of Whewellite [$Ca(C_2O_4){\cdot}H_2O$] and the Dehydration Mechanism of Caoxite [$Ca(C_2O_4){\cdot}3H_2O$]," *Miner. Mag.*, 69, 1, 77–88, **2005**.

[13] C. Sterling, "Crystal Structure of Weddellite," *Science*, 146, 3643, 518–519, **1964**.

[14] C. Conti, L. Brambilla, C. Colombo, D. Dellasega, G. D. Gatta, M. Realini, and G. Zerbi, "Stability and Transformation Mechanism of Weddellite Nanocrystals Studied by X-ray Diffraction and Infrared Spectroscopy," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12, 43, 14560, **2010**.

[15] R. Basso, G. Lucchetti, L. Zefiro, and A. Palenzona, "Caoxite, $Ca(H_2O)3(C_2O_4)$, a New Mineral from the Cerchiara Mine, Northern Apennines, Italy," *Neues Jahrb. fur Mineral. monatshefte*, 2, 84–86, **1997**.

[16] R. Martin and W. Blackburn, "Encyclopedia of Mineral Names: First Update," *Can. Mineral.*, 37, 1045–1078, **1999**.

[17] S. Deganello, A. R. Kampf, and P. B. Moore, "The Crystal Structure of Calcium Oxalate Trihydrate: $Ca(H_2O)3(C_2O_4)$," *Am. Mineral.*, 66, 859–865, **1981**.

[18] B. Tomazic and G. H. Nancollas, “The Kinetic of Dissolution of Calcium Oxalate Hydrates,” *J. Cryst. Growth*, 46, 355–361, **1979**.

[19] G. L. Gardner, “Nucleation and Crystal Growth of Calicum Oxalate Trihydrate,” *J. Cryst. Growth*, 30, 158–168, **1975**.

[20] A. Randall, “The Origin and Growth of Renal Calculi,” *Ann. Surg.*, 105, 6, 1009–1027, **1937**.

[21] N. Kutaish, P. Aggarwal, and D. Dollimore, “Thermal Analysis of Calcium Oxalate Samples Obtained by Various Preparative Routes,” *Thermochim. Acta*, 297, 131–137, **1997**.

[22] L. Walter-Lévy and J. Laniepce, “Sur la Formation des Hydrates de l’Oxalate de Calcium,” *Comptes Rendus l’Académie des Sci. Paris*, 254, 296–298, **1962**.

[23] G. Hammarsten, “Whewellite Solubility,” *Comptes rendus du Lab. Calsb.*, 17, 11, **1928**.

[24] E. Grases, A. Millan, and A. Conte, “Production of Calcium Oxalate Monohydrate , Dihydrate or Trihydrate. A Comparative Study,” *Urol. Res.*, 18, 17–20, **1990**.

[25] A. Millan, “Crystal Growth Shape of Whewellite Polymorphs: Influence of Structure Distortions on Crystal Shape,” *Cryst. Growth Des.*, 1, 3, 245–254, **2001**.

[26] C. Conti, M. Casati, C. Colombo, M. Realini, L. Brambilla, and G. Zerbi, “Phase Transformation of Calcium Oxalate Dihydrate-Monohydrate: Effects of Relative Humidity and New Spectroscopic Data,” *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 128, 413–9, **2014**.

[27] W. O. S. Doherty, O. L. Crees, and E. Senogles, “The Preparation of Calcium Dihydrate Crystals,” *Cryst. Res. Technol.*, 29, 4, 517–524, **1994**.

[28] G. Wiedemann and G. Bayer, “Kinetics of the Formation of Whewellite and Weddellite by Displacement Reactions,” *J. Therm. Anal.*, 33, 707–718, **1988**.

[29] H. G. Tiselius, “A Hypothesis of Calcium Stone Formation: An Interpretation of Stone Research During the Past Decades,” *Urol. Res.*, 39, 4, 231–243, **2011**.

[30] M. Franchini-Angela and D. Aquilano, “Growth Morphology of Weddellite $CaC_2O_4{\cdot}2xH_2O$,” *J. Cryst. Growth*, 47, 719–726, **1979**.

[31] Z. Chen, C. Wang, H. Zhou, L. Sang, and X. Li, “Modulation of Calcium Oxalate Crystallization by Commonly Consumed Green Tea,” *CrystEngComm*, 12, 3, 845, **2010**.

[32] N. Nassif, F. Martineau, O. Syzgantseva, F. Gobeaux, M. Willinger, T. Coradin, S. Cassaignon, T. Azaïs, and M. M. Giraud-Guille, “*In Vivo* Inspired Conditions to Synthesize Biomimetic Hydroxyapatite,” *Chem. Mater.*, 22, 12, 3653–3663, **2010**.

[33] J. Ihli, Y.-W. Wang, B. Cantaert, Y.-Y. Kim, D. C. Green, P. H. H. Bomans, N. A. J. M. Sommerdijk, and F. C. Meldrum, “Precipitation of Amorphous Calcium Oxalate in Aqueous Solution,” *Chem. Mater.*, 27, 11, 3999–4007, **2015**.

[34] M. Hajir, R. Graf, and W. Tremel, “Stable Amorphous Calcium Oxalate: Synthesis and Potential Intermediate in Biomineralization,” *Chem. Commun.*, 50, 49, 6534–6536, **2014**.

[35] A. Gehl, M. Dietzsch, M. Mondeshki, S. Bach, T. Häger, M. Panthöfer, B. Barton, U. Kolb, and W. Tremel, “Anhydrous Amorphous Calcium Oxalate Nanoparticles from Ionic Liquids: Stable Crystallization Intermediates in the Formation of Whewellite,” *Chem. - A Eur. J.*, 21, 50, 18192–18201, **2015**.

[36] J. Ihli, A. N. Kulak, and F. C. Meldrum, “Freeze-drying Yields Stable and Pure Amorphous Calcium Carbonate (ACC).,” *Chem. Commun.*, 49, 3134–6, **2013**.

[37] I. Petrov and B. Soptrajanov, “Infrared Spectrum of Whewellite,” *Spectrochim. Acta*, 31A, 309–316, **1975**.

[38] T. A. Shippey, “Vibrational Studies of Calcium Oxalate Monohydrate (Whewellite) and Anhydrous Phase of Calcium Oxalate,” *J. Mol. Struct.*, 63, 157–166, **1980**.

[39] J.-M. Ouyang, L. Duan, and B. Tieke, “Effects of Carboxylic Acids on the Crystal Growth of Calcium Oxalate Nanoparticles in Lecithin-Water Liposome Systems,” *Langmuir*, 19, 8980–8985, **2003**.

[40] L. Maurice-Estepa, P. Levillain, B. Lacour, and M. Daudon, “Advantage of Zero-crossing-Point First-derivative Spectrophotometry for the Quantification of Calcium Oxalate Crystalline Phases by Infrared Spectrophotometry,” *Clin. Chem. Acta*, 298, 1–11, **2000**.

[41] C. Conti, M. Casati, C. Colombo, E. Possenti, M. Realini, G. Diego Gatta, M. Merlini, L. Brambilla, and G. Zerbi, “Synthesis of Calcium Oxalate Trihydrate: New Data by Vibrational Spectroscopy and Synchrotron X-Ray Diffraction,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 150, 721–730, **2015**.

[42] D. Bazin, M. Daudon, P. Chevallier, S. Rouzière, E. Elkaim, D. Thiaudière, B. Fayard, E. Foy, P. A. Albouy, and G. André, “Les Techniques de Rayonnement Synchrotron au Service de la Caractérisation d’Objets Biologiques: un Exemple d’Application, les Calculs Rénaux,” *Ann. Biol. Clin.*, 64, 2, 125–139, **2006**.

[43] J. Tonannavar, G. Deshpande, J. Yenagi, S. B. Patil, N. A. Patil, and B. G. Mulimani, “Identification of Mineral Compositions in Some Renal Calculi by FT Raman and IR Spectral Analysis,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 154, 20–26, **2016**.

[44] D. Bazin, M. Daudon, C. Combes, and C. Rey, “Characterization and Some Physicochemical Aspects of Pathological Microcalcifications,” *Chem. Rev.*, 112, 10, 5092–5120, **2012**.

[45] M. Afzal, M. Iqbal, H. Ahmed, and J. Ahmed, “Spectroscopic Studies of Urinary Calculi in the Solide State,” *J. Chem. Soc. Pakistan*, 14, 3, 172–178, **1992**.

[46] L. Estepa and M. Daudon, “Contribution of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the Identification of Urinary Stones and Kidney Crystal Deposits,” *Biospectroscopy*, 347–369, **1997**.

[47] F. Cohen-Solal, B. Dabrowsky, J. C. Boulou, B. Lacour, and M. Daudon, “Automated Fourier Transform Infrared Analysis of Urinary Stones: Technical Aspects and Example of Procedures Applied to Carbapatite/Weddellite Mixtures,” *Appl. Spectrosc.*, 58, 6, 671–678, **2004**.

[48] V. Kodati, G. Tomasi, J. Tumurin, and A. Tu, “Raman Spectroscopic Identification of Calcium-Oxalate-Type Kidney Stone,” *Appl. Spectrosc.*, 44, 8, 1408–1411, **1990**.

[49] P. Carmona, J. Bellanato, and E. Escolar, “Infrared and Raman Spectroscopy of Urinary Calculi: A Review,” *Biospectroscopy*, 3, 331–346, **1997**.

[50] C. G. Kontoyannis, N. C. Bouropoulos, and P. G. Koutsoukos, “Use of Raman Spectroscopy for the Quantitative Analysis of Calcium Oxalate Hydrates: Application for the Analysis of Urinary Stones,” *Appl. Spectrosc.*, 51, 1, 64–67, **1997**.

[51] M. Daudon, M. F. Protat, R. J. Reveillaud, and H. Jaeschke-Boyer, “Infrared Spectrometry and Raman Microprobe in the Analysis of Urinary Calculi.,” *Kidney Int.*, 23, 6, 842–50, **1983**.

[52] R. L. Frost and M. L. Weier, “Thermal Treatment of Whewellite—a Thermal Analysis and Raman Spectroscopic Study,” *Thermochim. Acta*, 409, 1, 79–85, **2004**.

[53] J. R. Guerra-López, J. A. Güida, and C. O. Della Védova, “Infrared and Raman Studies on Renal Stones: The Use of Second Derivative Infrared Spectra,” *Urol. Res.*, 38, 5, 383–390, **2010**.

[54] Y.-C. Chiu, H.-Y. Yang, S.-H. Lu, and H. K. Chiang, “Micro-Raman Spectroscopy Identification of Urinary Stone Composition from Ureteroscopic Lithotripsy Urine Powder,” *J. Raman Spectrosc.*, 41, 136–141, **2010**.

[55] H. Babic-Ivancic, H. Furedi-Milhofer, B. Purgaric, N. Brnicevic, and Z. Despotovic, “Precipitation of Calcium Oxalates from High Ionic Strength Solutions,” *J. Cryst. Growth*, 71, 655–663, **1985**.

[56] K. Akhtar and I. U. Haq, “Chemical Modulation of Crystalline State of Calcium Oxalate with Nickel Ions,” *Clin. Chim. Acta*, 418, 12–16, **2013**.

[57] L. Walter-Lévy and J. Laniepce, “Sur la Thermolyse des Hydrates de l’Oxalate de Calcium,” *Comptes Rendus l’Académie des Sci. Paris*, 259, 4686–4688, **1964**.

[58] R. L. Frost and M. L. Weier, “Thermal Treatment of Weddellite—a Raman and Infrared Emission Spectroscopic Study,” *Thermochim. Acta*, 406, 1–2, 221–232, **2003**.

[59] A. A. Christy, E. Nodland, A. K. Burnham, O. M. Kvalheim, and B. Dahl, “Determination of Kinetic Parameters for the Dehydration of Calcium Oxalate Monohydrate by Diffuse Reflectance FT-IR Spectroscopy,” *Appl. Spectrosc.*, 48, 5, 561–568, **1994**.

[60] A. Millan, O. Sohnel, and F. Grases, “The Influence of Crystal Morphology on the Kinetics of Growth of Calcium Oxalate Monohydrate,” *J. Cryst. Growth*, 179, 231–239, **1997**.

[61] M. Franchini-Angela and D. Aquilano, “Theoretical Growth Morphology of Whewellite $CaC_2O_4.H_2O$,” *Phys Chem Miner.*, 10, 114–120, **1984**.

[62] W. M. M. Heijnen, “The Theoretical Growth Morphology of Calcium Oxalate Dihydrate,” *J. Cryst. Growth*, 67, 324–336, **1984**.

[63] W. M. M. Heijnen, “The Growth Morphology of Calcium Oxalate Trihydrate,” *J. Cryst. Growth*, 57, 216–232, **1982**.

[64] J. C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. **1994**.

[65] H. G. Tiselius, “The Role of Calcium Phosphate in the Development of Randall’s Plaques,” *Urol. Res.*, 41, 5, 369–377, **2013**.

[66] M. I. Dominguez, J. Carpena, D. Borschnek, M. A. Centeno, J. A. Odriozola, and J. Rose, “Apatite and Portland/Apatite Composite Cements Obtained using a Hydrothermal Method for Retaining Heavy Metals,” *J. Hazard. Mater.*, 150, 1, 99–108, **2008**.

[67] E. Deydier, R. Guilet, and P. Sharrock, “Beneficial Use of Meat and Bone Meal Combustion Residue: ‘An Efficient Low Cost Material to Remove Lead from Aqueous Effluent,’” *J. Hazard. Mater.*, 101, 1, 55–64, **2003**.

[68] K. Mori, K. Yamaguchi, T. Hara, T. Mizugaki, K. Ebitani, and K. Kaneda, “Controlled Synthesis of Hydroxyapatite-supported Palladium Vomplexes as Highly Efficient Heterogeneous Catalysts,” *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 39, 11572–11573, **2002**.

[69] J. C. Elliott, P. E. Mackie, and R. A. Young, “Monoclinic Hydroxyapaptite,” *Science*, 180, 4090, 1055–1057, **1973**.

[70] Y. Suetsugu and J. Tanaka, “Crystal Growth and Structure Analysis of Twin-free Monoclinic Hydroxyapatite,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 13, 8, 767–772, **2002**.

[71] K. Sudarsanan and R. A. Young, “Significant Precision in Crystal Structural Details. Holly Springs Hydroxyapatite,” *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, 25, 8, 1534–1543, **1969**.

[72] T. Leventouri, “Synthetic and biological hydroxyapatites: Crystal structure questions,” *Biomaterials*, 27, 18, 3339–3342, **2006**.

[73] M. Inoue, H. Nagatsuka, H. Tsujigiwa, M. Inoue, R. LeGeros, T. Yamamoto, and N. Nagai, “*In Vivo* Effect of Fluoride-substituted Apatite on Rat Bone.,” *Dent. Mater. J.*, 24, 3, 398–402, **2005**.

[74] D. Laurencin, N. Almora-Barrios, N. H. de Leeuw, C. Gervais, C. Bonhomme, F. Mauri, W. Chrzanowski, J. C. Knowles, R. J. Newport, A. Wong, Z. Gan, and M. E. Smith, “Magnesium Incorporation Into Hydroxyapatite,” *Biomaterials*, 32, 7, 1826–1837, **2011**.

[75] E. Landi, J. Uggeri, S. Sprio, A. Tampieri, and S. Guizzardi, “Human Osteoblast Behavior on As-synthesized $SiO_4$ and B-$CO_3$ Co-substituted Apatite,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 94, 1, 59–70, **2010**.

[76] A. Porter, N. Patel, R. Brooks, S. Best, N. Rushton, and W. Bonfield, “Effect of Carbonate Substitution on the Ultrastructural Characteristics of Hydroxyapatite Implants,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 16, 10, 899–907, **2005**.

[77] Y. Doi, H. Iwanaga, T. Shibutani, Y. Moriwaki, and Y. Iwayama, “Osteoclastic Responses to Various Calcium Phosphates in Cell Cultures,” *J. Biomed. Mater. Res.*, 47, 3, 424–433, **1999**.

[78] O. Frank-Kamenetskaya, A. Kol’tsov, M. Kuz’mina, M. Zorina, and L. Poritskaya, “Ion Substitutions and Non-stoichiometry of Carbonated Apatite-(CaOH) Synthesised by Precipitation and Hydrothermal Methods,” *J. Mol. Struct.*, 992, 1–3, 9–18, **2011**.

[79] S. Gomes, J. M. Nedelec, E. Jallot, D. Sheptyakov, and G. Renaudin, “Silicon Location in Silicate-Substituted Calcium Phosphate Ceramics Determined by Neutron Diffraction,” *Cryst. Growth Des.*, 11, 9, 4017–4026, **2011**.

[80] M. Bohner, “Silicon-Substituted Calcium Phosphates - A Critical View,” *Biomaterials*, 30, 32, 6403–6406, **2009**.

[81] A. M. Pietak, J. W. Reid, M. J. Stott, and M. Sayer, “Silicon Substitution in the Calcium Phosphate Bioceramics,” *Biomaterials*, 28, 28, 4023–4032, **2007**.

[82] H. Pizzala, S. Caldarelli, J. Eon, D. Laurencin, and M. E. Smith, “A Solid-State NMR Study of Lead and Vanadium Substitution into Hydroxyapatite,” *Society*, 10, 5145–5152, **2009**.

[83] S. Sugiyama, T. Moriga, H. Hayashi, and J. B. Moffat, “Characterization of Calcium, Strontium, Barium and Lead Hydroxyapatites: X-ray Diffraction, Photoelectron, Extended X-ray

Absorption Fine Structure and MAS NMR Spectroscopies," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 74, 1, 187–192, **2001**.

[84] S. Takemoto, Y. Kusudo, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, and S. Takashima, "Selective Protein Adsorption and Blood Compatibility of Hydroxy-Carbonate Apatites," *J. Biomed. Mater. Res. A*, 69, 3, 544–551, **2004**.

[85] M. E. Fleet, "Infrared Spectra of Carbonate Apatites: v2-Region Bands," *Biomaterials*, 30, 8, 1473–1481, **2009**.

[86] M. C. Chang and J. Tanaka, "FT-IR study for Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite Cross-linked by Glutaraldehyde," *Biomaterials*, 23, 24, 4811–4818, **2002**.

[87] E. Balan, S. Delattre, D. Roche, L. Segalen, G. Morin, M. Guillaumet, M. Blanchard, M. Lazzeri, C. Brouder, and E. K. H. Salje, "Line-broadening Effects in the Powder Infrared Spectrum of Apatite," *Phys. Chem. Miner.*, 38, 2, 111–122, **2011**.

[88] A. Antonakos, E. Liarokapis, and T. Leventouri, "Micro-Raman and FTIR Studies of Synthetic and Natural Apatites," *Biomaterials*, 28, 19, 3043–3054, **2007**.

[89] A. B. Sonju Clasen and I. E. Ruyter, "Quantitative Determination of Type A and Type B Carbonate in Human Deciduous and Permanent Enamel by Means of Fourier Transform Infrared Spectrometry," *Adv. Dent. Res.*, 11, 4, 523–527, **1997**.

[90] Y. Doi, Y. Moriwaki, T. Aoba, M. Okazaki, J. Takahashi, and K. Joshin, "Carbonate Apatites from Aqueous and Non-aqueous Media Studied by ESR, IR, and X-ray Diffraction: Effect of $NH^{4+}$ Ions on Crystallographic Parameters," *J. Dent. Res.*, 61, 2, 429–434, **1982**.

[91] M. Fleet, *Carbonated Hydroxyapatite*, Pan Standf. **2014**.

# Chapitre 2 : Résonance Magnétique Nucléaire et *Dynamic Nuclear Polarization*

**1. RMN à l'état solide : généralités ..... 67**
a) Interactions pour un spin I = ½ ..... 69
i. Anisotropie de Déplacement Chimique (Chemical Shift Anisotropy, CSA) ..... 70
ii. Interaction dipolaire directe D ..... 71
iii. Interaction de couplage scalaire J ..... 72
b) Noyaux quadripolaires : spécificités ..... 73
i. Interaction quadripolaire au 1$^{er}$ ordre ..... 75
ii. Interaction quadripolaire au 2$^{nd}$ ordre ..... 76

**2. Rotation à l'angle magique ..... 77**
a) Anisotropie de déplacement chimique (Chemical Shift Anisotropy *CSA*) ..... 77
b) Interaction dipolaire directe D ..... 79
c) Interaction quadripolaire ..... 79
i. Interaction quadripolaire 1$^{er}$ ordre ..... 80
ii. Interaction quadripolaire au 2$^{nd}$ ordre ..... 80
iii. Le cas spécifique du $^{43}$Ca ..... 82
d) Ultra hauts champs magnétiques et ultra haute fréquence de rotation MAS ..... 83

**3. Séquences d'impulsions ..... 83**
a) *High Power DECoupling* (HPDEC) ..... 83
b) *Cross Polarization* (CP) ..... 84
c) *HETeronuclear CORrelation* (HETCOR) et *Decoupling Using Mind-Boggling Optimization* (DUMBO) ..... 85
d) Saturation-récupération ..... 86

**4. *Dynamic Nuclear Polarization* (DNP) ..... 86**
a) Bref historique ..... 88
b) Eléments de théorie ..... 89
i. L'effet Overhauser (OE) ..... 89
ii. L'effet solide ou Solid-Effect (SE) ..... 89
iii. Cross-Effect (CE) ..... 90
iv. Mélange Thermique ou Thermal Mixing (TM) ..... 91
c) Tendances actuelles de la DNP MAS ..... 91
d) Méthodologie et préparation des échantillons ..... 92
e) Avantages et inconvénients de l'expérience DNP ..... 93

**5. Calculs *ab initio* de paramètres RMN. ..... 95**
a) Théorie de la fonctionnelle de la densité ..... 95
b) Les différentes approximations ..... 96
c) Ondes planes et approximation des pseudopotentiels ..... 97
d) Déplacement chimique : approche GIPAW (*Gauge Including Projector Augmented Wave*) ... 97

# Chapitre 2: Résonance Magnétique Nucléaire et *Dynamic Nuclear Polarization*

Avant d'aborder la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), il convient d'expliquer rapidement ce « qu'est un spin » (si cela est possible !). Nous verrons ensuite comment il intervient dans cette méthode d'analyse spectroscopique. Le spin est une *propriété intrinsèque* de certaines particules (noyau, électron, neutron, photon *etc.*), caractérisé mathématiquement par un moment angulaire $\vec{I}$ : on démontre (théorème de Wigner-Eckart) que si $\vec{I} \neq \vec{0}$, alors il existe simultanément un moment magnétique, $\vec{\mu}$, colinéaire à $\vec{I}$ tel que :

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I} \tag{2-1}$$

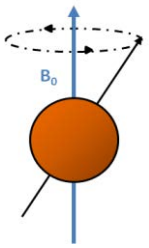



**Figure 2-1 : Représentation schématique d'un spin nucléaire en présence d'un champ magnétique $B_0$.**

Sous l'influence d'un champ magnétique externe $\mathbf{B_0}$, le moment magnétique effectue un mouvement de précession (voir Figure 2-1). Cette précession s'effectue à une vitesse angulaire connue sous le nom de pulsation ($\omega_0$) ou fréquence de Larmor ($\nu_0$):

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \tag{2-2}$$

ou

$$\nu_0 = |\gamma| B_0 / 2\pi \tag{2-3}$$

avec $\gamma$ le rapport gyromagnétique (propre à chaque noyau) en $rad.s^{-1}.T^{-1}$, $\gamma$ peut être positif ou négatif.

Nous utilisons ici les notations de Levitt [1] relatives au signe relatif de $\omega_0$.

Les premières expériences de magnétisme nucléaire à l'aide de jets moléculaires ont été effectuées par Rabi *et coll.* [2]. Cet article est fondamental, dans le sens où il établit que les méthodes de résonance sont optimales pour la détection du magnétisme nucléaire. Il est d'ailleurs fait mention dans une note de l'article de l'influence cruciale de Gorter sur la pertinence de cette méthode de détection [3]. La Résonance Magnétique Nucléaire sera élargie à la matière condensée (solides, liquides, gaz sous pression) quelques années plus tard par Bloch [4] et Purcell [5] qui peuvent être considérés comme les pères fondateurs de la RMN moderne. Ils obtiendront ensemble le Prix Nobel de physique en 1952 : « *for their development of new methods for nuclear magnetic precision measurements and discoveries in connection therewith* ». Le chapitre 1 de l'ouvrage d'A. Abragam

[6] présente un excellent résumé des différentes méthodes de détection mises en œuvre en magnétisme nucléaire.

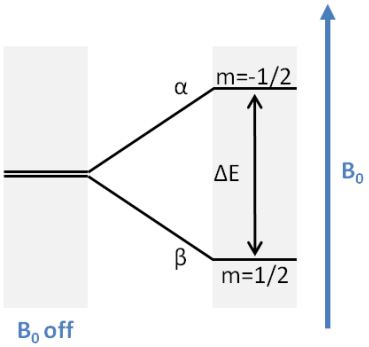



**Figure 2-2 : Levée de dégénérescence pour un spin I = ½ (ici γ > 0).**

D'un point de vue énergétique, les isotopes possédant un spin nucléaire non nul, lorsqu'ils sont placés en présence d'un champ magnétique intense, $\mathbf{B_0}$, vont subir une *levée de dégénérescence* (Figure 2-2), *i.e.* une séparation des niveaux d'énergie ; c'est l'*effet Zeeman*. Il y aura alors deux niveaux d'énergie différents caractérisés par

$$E_{\mathrm{m}} = -\gamma m \hbar B_0 \tag{2-4}$$

(avec –I ≤ m ≤ +I).

Dans un traitement quantique, cet effet peut être traduit par un *Hamiltonien* :

$$\hat{H}_{\mathrm{Z}} = -\gamma B_0 \hat{I}_z \tag{2-5}$$

avec $\hat{I}_z$ la projection de l'opérateur de spin selon l'axe z, (on prend ici la convention ħ = 1).

Lorsqu'une radio-fréquence correspondant à la fréquence de Larmor du spin étudié interagit avec l'échantillon, il y aura des transitions entre états de spins : on parle alors de résonance et il y a création d'une aimantation transversale (perpendiculaire au champ $\mathbf{B_0}$). Le retour à l'état d'équilibre (la relaxation) entraîne l'émission d'une onde électromagnétique qui peut être détectée par une bobine : c'est ce qui est mesuré par RMN *via* l'enregistrement du FID (*Free Induction Decay*) dans le domaine temporel. Ce phénomène est décrit principalement par deux temps de relaxation : $T_1$ et $T_2$ (voir Figure 2-3).

- $T_1$ correspond au temps de relaxation longitudinal, spin-réseau. Il peut être visualisé par le retour de la magnétisation selon l'axe z (parallèle à $\mathbf{B_0}$).
- $T_2$, correspond au temps de relaxation transverse, spin-spin. Il est directement visualisé par la perte de cohérence dans le plan de mesure x-y (perpendiculaire à $\mathbf{B_0}$).

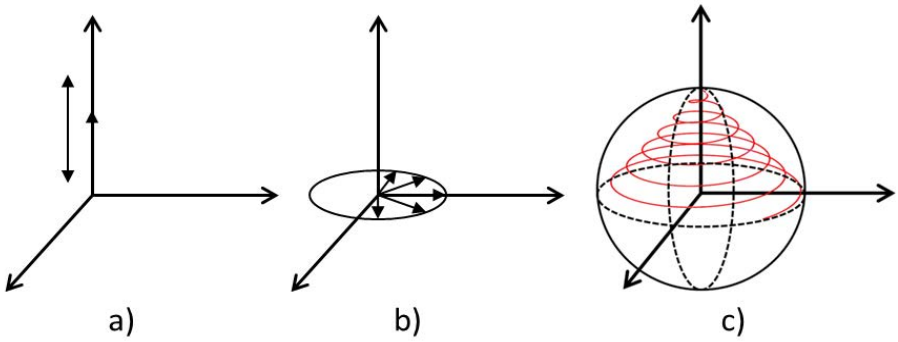



Figure 2-3 : Illustration très succincte de : a) Relaxation $T_1$, b) Relaxation $T_2$, 3) Relaxation $T_1$-$T_2$.

D'après la *loi fondamentale de Boltzmann de la mécanique statistique,* les populations $P_m$ des niveaux d'énergie sont proportionnelles à :

$$\exp\left(\frac{-E_m}{kT}\right) = \exp\left(\frac{\gamma m \hbar B_0}{kT}\right) \quad (2\text{-}6)$$

avec k = 1,38.$10^{-23}$ J.$K^{-1}$ la constante de Boltzmann.

A température ambiante et pour $\mathbf{B_0}$ entre 10 et 20 T, les écarts ΔE (Figure 2-2) sont très faibles et les $P_m$ sont quasiment identiques. Il en résulte que la sensibilité de la RMN comparée à d'autres techniques spectroscopiques (comme la RPE) est bien plus faible. Cependant, il s'agit d'une technique non-destructive, non invasive et applicable à de nombreux types de matériaux. Plusieurs méthodes permettent d'augmenter la sensibilité de la RMN :

- l'augmentation du nombre de spins, c'est-à-dire l'augmentation de la quantité d'échantillon à analyser,
- l'enrichissement isotopique,
- l'augmentation du champ externe $\mathbf{B_0}$,
- la diminution de la température,
- l'utilisation de séquences d'impulsions spécifiques comme la polarisation croisée (notée CP par la suite),
- les techniques d'hyperpolarisation ($^{129}$Xe, *Dynamic Nuclear Polarization* (notée DNP dans la suite), *etc.*),
- l'utilisation de technologies d'instrumentation poussées (micro-bobines…).

## 1. RMN à l'état solide : généralités

L'analyse d'un spectre RMN peut être considérée comme celle des interactions influençant l'*effet Zeeman nucléaire.* Tous les *Hamiltoniens* des interactions prises en compte en RMN peuvent être considérés comme des perturbations de l'*Hamiltonien Zeeman* ($\widehat{H}_Z$) vu précédemment, en général au 1$^{er}$ ou au 2$^{nd}$ ordre, au sens des perturbations. Ces différentes interactions peuvent apporter des informations locales sur le noyau étudié. Dans cette section, nous analyserons rapidement les différentes interactions mises en jeu, puis nous expliciterons les différentes séquences d'impulsions

utilisées au cours de cette thèse. Les noyaux quadripolaires rencontrés feront l'objet d'une courte partie. Nous présenterons également certains aspects théoriques et expérimentaux de la DNP MAS.

### a) Interactions pour un spin I = ½

On considère généralement :

- l'interaction de déplacement chimique dont la moyenne est le déplacement chimique isotrope.
- l'interaction dipolaire directe (D), homonucléaire ou hétéronucléaire.
- l'interaction quadripolaire (I > ½).
- l'interaction de couplage scalaire J (ou indirecte).

La Figure 2-4 présente un résumé des interactions agissant sur un système de spins (i,j). On distingue : ***(i)*** les interactions *externes* comme l'interaction Zeeman et les champs radiofréquence (RF) à la résonance (chemin 1), ***(ii)*** les interactions *internes* au système de spins (chemins 2 et 3) et enfin la relaxation nucléaire et électronique (chemins 4 et 5).

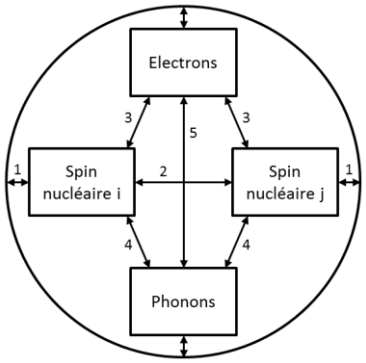



**Figure 2-4 : 1 : Interaction Zeeman. 2 : Interaction dipolaire directe. 3 : Couplage scalaire, interaction quadripolaire, interaction paramagnétique. 4-5 : Relaxation d'après** [7].

Le Tableau 2-1 donne un aperçu des ordres de grandeur de ces interactions en RMN à l'état solide. La suite de cette section les décrit de manière plus détaillée.

**Tableau 2-1 : Ordre de grandeur des interactions en RMN à l'état solide (en Hz).**

| Zeeman | Quadripolaire | CSA | Dipolaire | Scalaire J |
|---|---|---|---|---|
| $\sim 10^8$ | $\sim 10^6$ | $\sim 10^3$-$10^4$ | $\sim 10^3$-$10^4$ | $\sim < 100$ |

#### i. *Déplacement Chimique*

Cette interaction reflète l'environnement chimique et permet d'obtenir des informations sur la nature des liaisons chimiques impliquées et sur la symétrie locale. Les électrons qui entourent le noyau créent un champ magnétique secondaire qui s'oppose en général au champ principal $\mathbf{B_0}$. Ce champ local contribue au champ total « vu » par le noyau, **B'**. C'est le phénomène d'écrantage du cortège électronique (Figure 2-5). En solution isotrope,

$$B' = B_0(1 - \sigma) \qquad (2\text{-}7)$$

et

$$\hat{H}\mathrm{z} + \hat{H}_{\mathrm{CS}} = -\gamma B' \hat{I}_{\mathrm{z}} \tag{2-8}$$

où $\sigma$ est le coefficient d'écrantage.

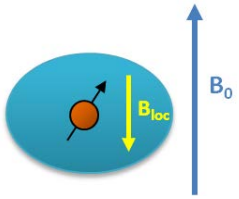



Figure 2-5 : Représentation schématique du tenseur d'écrantage d'après [1].

Le déplacement chimique est décrit par une composante isotrope et une autre anisotrope.

L'anisotropie de déplacement chimique (*Chemical shift Anisotropy CSA*) est une interaction propre au solide car moyennée à sa valeur isotrope par les mouvements browniens en solution. Cette interaction est bien décrite mathématiquement par un tenseur de rang 2 que l'on supposera symétrique [7], [8] (voir généralisation ci-dessous) : il en résulte un élargissement des raies en RMN en phase solide.

### *ii. Interaction dipolaire directe D*

L'interaction dipolaire directe représentée par l'*Hamiltonien* $\hat{H}_{\mathrm{D}}$ provient du couplage *via* l'espace entre les moments magnétiques de deux noyaux (Figure 2-6). Elle peut être homonucléaire ou hétéronucléaire. La constante de couplage dipolaire direct est donnée par l'équation suivante (exprimée en Hz) :

$$D_{\mathrm{ij}} = -\frac{\mu_0}{4\pi}\frac{\gamma_{\mathrm{i}}\gamma_{\mathrm{j}}\hbar}{{r_{\mathrm{ij}}}^3} \tag{2-9}$$

avec $\mu_0$ la perméabilité magnétique du vide, $\gamma_{\mathrm{i,j}}$ les rapports gyromagnétiques des noyaux i,j, $r_{\mathrm{i,j}}$ la distance internucléaire et ħ la constante de Planck réduite.

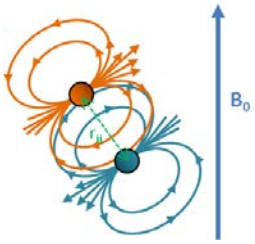



Figure 2-6 : Représentation du couplage dipolaire direct entre deux spins i et j d'après [1].

L'*Hamiltonien* dipolaire *homonucléaire* entre deux spins i et j s'exprime ainsi :

$$\hat{H}_{\mathrm{D,\ homonucléaire}} = \frac{1}{2}(3cos^2\theta_{\mathrm{ij}} - 1)D_{\mathrm{ij}}(3\hat{I}_{\mathrm{iz}}.\hat{I}_{\mathrm{jz}} - \hat{I}_{\mathrm{i}}.\hat{I}_{\mathrm{j}}) \tag{2-10}$$

avec $\theta_{ij}$ l'angle entre la direction de la paire de spins i-j par rapport au champ $\mathbf{B_0}$.

De même, l'*Hamiltonien* dipolaire *hétéronucléaire* entre deux spins i et j s'écrit :

$$\widehat{H}_{\mathrm{D,\,hétéronucléaire}} = \frac{1}{2}(3cos^2\theta_{ij} - 1)D_{ij}2\hat{I}_{iz}.\hat{I}_{jz} \tag{2-11}$$

A partir de la mesure de $D_{ij}$, il est ainsi possible de remonter aux distances interatomiques. En solution isotrope, les interactions dipolaires (parties séculaires) sont moyennées à zéro (les parties non séculaires de l'interaction dipolaire participent néanmoins à la relaxation nucléaire).

### *iii. Interaction de couplage scalaire J*

Le couplage scalaire ou interaction dipolaire indirecte (représentée par l'*Hamiltonien* $\widehat{H}_J$) concerne les interactions entre spins voisins mais par l'intermédiaire des électrons de liaison (voir Figure 2-7). On parle d'interaction à « travers les liaisons » (*through bonds*) par opposition à l'interaction dipolaire qui agit « à travers l'espace » (*through space*). Elles sont en général bien moins « intenses » que les interactions de déplacement chimique et les couplages dipolaires (voir Tableau 2-1). En RMN à l'état solide elles sont plus difficilement détectables mais des expériences MAS (voir partie 2 de ce Chapitre) à très haute fréquence de rotation permettent de les révéler.

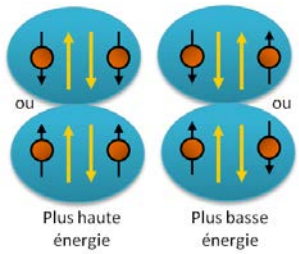



**Figure 2-7 : Représentation schématique du couplage scalaire J d'après** [1].

En solution isotrope, l'*Hamiltonien* J *homonucléaire* s'écrit :

$$\widehat{H}_{\mathrm{J,\,homonucléaire}} = 2\pi J_{ij}\hat{I}_i.\hat{I}_j \tag{2-12}$$

L'*Hamiltonien* J *hétéronucléaire* s'écrit pour sa part :

$$\widehat{H}_{\mathrm{J,\,hétéronucléaire}} = 2\pi J_{ij}\hat{I}_{iz}.\hat{I}_{jz} \tag{2-13}$$

$J_{ij}$ est une valeur algébrique.

En prenant toutes ces interactions en considération, l'*Hamiltonien* du système (sans l'interaction quadripolaire, ni les champs RF) est donné par :

$$\widehat{H} = \widehat{H}_Z + \widehat{H}_{CS} + \widehat{H}_D + \widehat{H}_J \tag{2-14}$$

$\widehat{H}_{CS}$, $\widehat{H}_D$ et $\widehat{H}_J$ correspondent aux *Hamiltoniens* des interactions *internes* au système de spins. Dans tout ce qui précède, et ce pour toutes les interactions rencontrées, seules les parties isotropes de celles-ci ont été prises en compte dans l'écriture des *Hamiltoniens* associés. On remarquera que dans le cas de l'*Hamiltonien* $\widehat{H}_D$, de valeur isotrope nulle, la dépendance explicite de l'*Hamiltonien*

en fonction d'un paramètre géométrique ($\theta_{ij}$) a volontairement été introduite. Cette dépendance est caractéristique de *l'anisotropie* de l'interaction dipolaire. De fait, toutes les interactions rencontrées en RMN sont anisotropes par nature (CSA, anisotropie de J). Une très bonne approximation consiste à les représenter mathématiquement par des tenseurs de rang 2, *symétriques* [7]. Pour chaque interaction agissant au niveau d'un spin donné, on peut définir un repère perpendiculaire normé, centré au noyau, tel que la représentation matricielle de l'interaction soit diagonale. Ce repère correspond au *repère des axes principaux.* Les valeurs diagonales sont appelées *valeurs propres* de l'interaction $\delta_{XX}$, $\delta_{YY}$ et $\delta_{ZZ}$ pour l'interaction CSA et $J_{XX}$, $J_{YY}$, $J_{ZZ}$ pour l'interaction J. La moyenne arithmétique des valeurs propres correspond à la valeur *isotrope* $\delta_{iso}$ = 1/3 ($\delta_{XX}$ + $\delta_{YY}$ + $\delta_{ZZ}$) et $J_{iso}$ = 1/3($J_{XX}$ + $J_{YY}$ + $J_{ZZ}$). A l'état solide (en supposant l'absence totale de mouvements locaux), l'anisotropie des interactions se traduit par un élargissement de la raie de résonance associée à un spin nucléaire. Au premier ordre en perturbation, la forme de raie observée se décrit mathématiquement de manière identique, et ce, quelle que soit l'interaction considérée. Ce point est fondamental pour appréhender l'action de la rotation à l'angle magique. Une approche quantitative des interactions sera donnée en section 2 de ce Chapitre.

En RMN en phase solide, le spectre d'un échantillon sera donc constitué d'autant de raies larges que de sites cristallographiques indépendants. Dans le cas de solides désordonnés, des distributions des différentes interactions seront à prendre en compte.

### b) Noyaux quadripolaires : spécificités

L'interaction quadripolaire est particulière car elle ne concerne que les noyaux ayant un nombre de spin I strictement supérieur à ½ (entier ou ½ entier). Cependant, au regard du tableau périodique (Figure 2-8), près de 75% des noyaux sont caractérisée par un spin I > ½. Cette interaction intervient donc dans de nombreuses expériences RMN et doit être prise en considération lors de l'étude de matériaux d'intérêt.

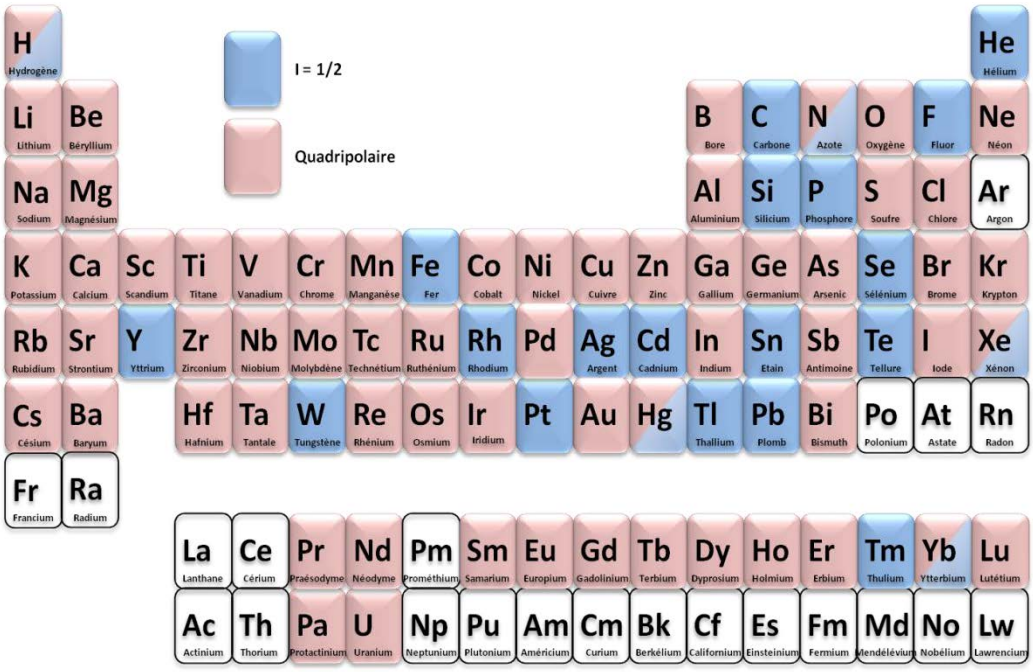



**Figure 2-8 : Tableau périodique des éléments (I = ½ et noyaux quadripolaires).**

Les noyaux quadripolaires possèdent une charge non sphérique, conduisant à un moment quadripolaire Q (celui-ci est tabulé pour chaque noyau quadripolaire). Il existe alors une interaction entre Q et le gradient de champ électrique (EFG, Electric Field Gradient, $V_{xx}$, $V_{yy}$, $V_{zz}$) résultant de la distribution locale des charges. Contrairement à d'autres interactions magnétiques, l'amplitude de l'interaction quadripolaire peut atteindre des valeurs très élevées (jusqu'à plusieurs dizaines de MHz voir Figure 2-9). Etant donné que cette interaction peut être comparable à l'interaction *Zeeman*, ses effets doivent être calculés au premier et au second ordre en perturbation. De même que pour les interactions précitées, l'interaction quadripolaire peut être représentée par un tenseur de rang 2, symétrique et de trace nulle (comme l'interaction dipolaire), du fait de la loi de Laplace.

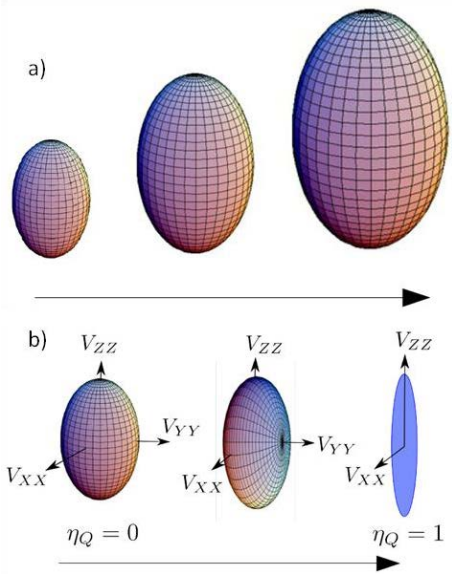



**Figure 2-9 : a) Augmentation de $C_Q$ avec $\eta_Q = 0$ constant. b) Augmentation de $\eta_Q$ avec $C_Q$ constant d'après [9]. Pour $\eta_Q = 0$, $V_{XX} = V_{YY}$**

Du fait de la trace nulle, l'interaction Q peut être décrite par uniquement deux paramètres (voir Figure 2-9) :

La constante de couplage quadripolaire, $C_Q$, est :

$$C_Q = \frac{eQV_{ZZ}}{h} \tag{2-15}$$

$C_Q$ est une grandeur algébrique, donnée en général en MHz, $V_{ZZ}$ est la composante selon z du gradient de champ électrique et h est la constante de Planck

Le paramètre d'asymétrie du gradient de champ électrique, $\eta_Q$, est :

$$\eta_Q = \frac{V_{XX} - V_{YY}}{V_{ZZ}} \tag{2-16}$$

avec $0 \leq \eta_Q \leq 1$.

Pour un noyau quadripolaire, l'*Hamiltonien* complet devient :

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_{CSA} + \hat{H}_D + \hat{H}_J + \hat{H}_Q \quad (2\text{-}17)$$

Compte tenu de la grandeur de cette interaction (Tableau 2-1), l'*Hamiltonien quadripolaire* peut être séparé en deux parties :

$$\hat{H}_Q = \hat{H}_Q^{(1)} + \hat{H}_Q^{(2)} \quad (2\text{-}18)$$

Ces deux parties correspondent à l'interaction quadripolaire au 1$^{er}$ et au 2$^{nd}$ ordre, respectivement. Pour I > ½ et *demi-entier*, les niveaux d'énergie sont classiquement repérés par $m_I$ (demi-entiers). La transition ±½⇔∓½ correspond à la transition *centrale*. Les autres transitions à 1 quantum correspondent aux transitions *satellites*. L'interaction quadripolaire au 1$^{er}$ ordre n'affecte que les transitions satellites (ST) tandis que l'interaction au 2$^{nd}$ ordre affecte à la fois les transitions satellites et la transition centrale (CT) [10].

### *i. Interaction quadripolaire au 1$^{er}$ ordre*

L'interaction quadripolaire au 1$^{er}$ ordre perturbe les niveaux *Zeeman* et conduit, par exemple pour un spin 7/2, à sept transitions distinctes à 1 quantum ; 6 ST et 1 CT (Figure 2-10). Le choix de I = 7/2 est justifié par nos études par RMN du calcium-43 (voir partie 2 c). ii.). On notera de plus que $\gamma(^{43}Ca) < 0$ ($-1{,}803.10^7$ rad.s$^{-1}$.T$^{-1}$). Comme évoqué précédemment, la transition centrale n'est pas affectée à cet ordre de perturbation. En mode statique, cette interaction est dépendante de l'orientation du repère des axes principaux du gradient de champ électrique du noyau par rapport à $\mathbf{B_0}$. Il faut alors sommer les contributions relatives à toutes les orientations des cristallites dans l'échantillon pour avoir la forme complète d'une poudre microcristalline. Cela conduit à la superposition d'une forme large et symétrique due aux ST et une raie non élargie correspondant à la CT (Figure 2-10).

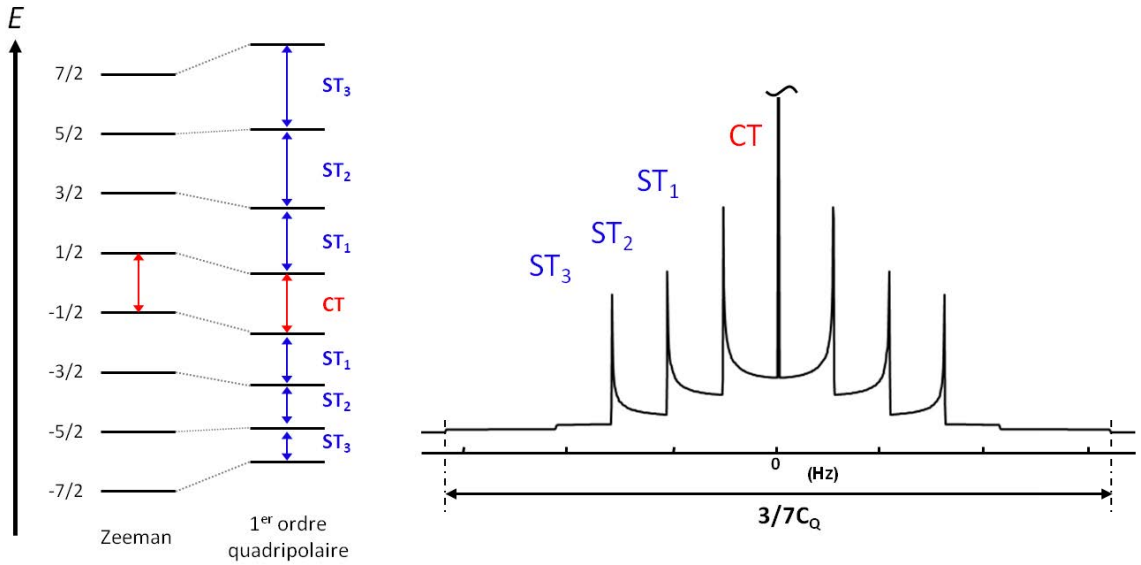



**Figure 2-10 : Niveaux d'énergie pour un noyau de spin I = 7/2 avec γ < 0 (ce cas s'applique au $^{43}$Ca). Les effets de l'interaction quadripolaire au premier ordre n'affectent pas la CT (ici $\eta_Q = 0$). La CT est centrée arbitrairement à 0 Hz.**

On notera que l'interaction quadripolaire au 1$^{er}$ ordre est indépendante du champ magnétique externe $\mathbf{B_0}$.

### ii. *Interaction quadripolaire au 2nd ordre*

Quand la constante quadripolaire $C_Q$ devient trop élevée, l'approximation de l'*Hamiltonien* par $\widehat{H}_Q^{(1)}$ n'est plus suffisante pour décrire le spectre. Il faut alors prendre en compte l'interaction quadripolaire au 2nd ordre, $\widehat{H}_Q^{(2)}$. Dans ce cas-là, elle affecte toutes les transitions, CT et ST (Figure 2-11).

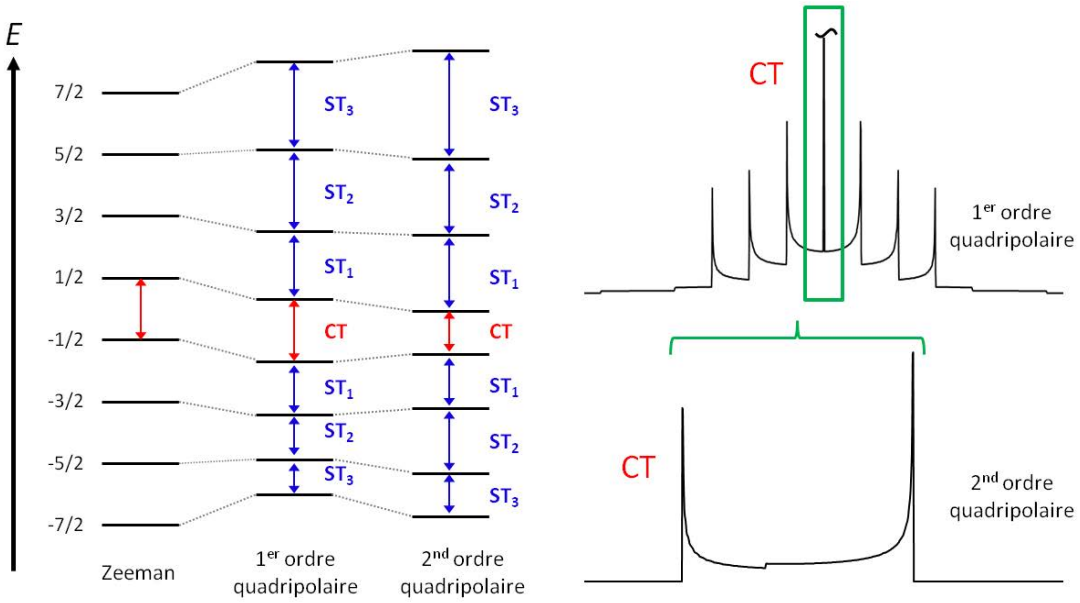



**Figure 2-11 : Niveaux d'énergie pour un noyau de spin I = 7/2 avec γ < 0. Les effets de l'interaction quadripolaire au second ordre affectent la CT et les ST (ici $\eta_Q = 0$).**

A cet ordre, l'interaction est proportionnelle à $C_Q^2$ mais inversement proportionnelle au champ magnétique $\mathbf{B_0}$.

Le tableau suivant résume les différentes informations accessibles *via* l'étude des interactions présentes en RMN du solide.

**Tableau 2-2 : Informations récoltées par type d'interaction.**

| Interactions | Informations |
|---|---|
| **Anisotropie de déplacement chimique** | Coordinence<br>Géométrie<br>Symétrie locale |
| **Interaction dipolaire** | Distances<br>Connectivités spatiales |
| **Couplage scalaire J** | Liaisons chimiques<br>Connectivités chimiques |
| **Interaction quadripolaire** | Symétrie locale<br>Gradient de champ électrique<br>Charges environnantes |

## 2. Rotation à l'angle magique

En 1959, Andrew *et coll.* [11] et Lowe *et coll.* [12] ont démontré qu'il était possible de moyenner les composantes anisotropes du signal dues aux différentes interactions grâce à la rotation à l'angle magique (MAS) (Figure 2-12). Cet angle particulier, ~ 54,74°, permet de moyenner les interactions au premier ordre dépendant de $\frac{1}{2}(3\cos^2\psi - 1)$ et donc d'affiner les signaux (augmentation de la résolution spectrale). L'angle magique $\psi_m$ correspond à :

$$P_2(\cos\psi) = \frac{1}{2}(3\cos^2\psi - 1) = 0 \Rightarrow \psi_m = 54{,}74° \quad (2\text{-}19)$$

$P_2 \cos\psi$ correspond au polynôme de Legendre de degré 2.

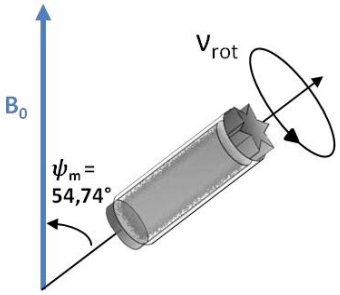



**Figure 2-12 : Rotation à l'angle magique (MAS). $\psi_m$ correspond à l'angle magique.**

La fréquence de rotation du rotor doit être suffisamment élevée pour pouvoir moyenner de façon efficace les composantes anisotropes des différentes interactions. Globalement, elle doit être au moins de l'ordre de grandeur de l'amplitude de l'anisotropie. Ainsi pour moyenner l'interaction dipolaire hétéronucléaire totalement entre un noyau de $^{13}C$ et un proton $^{1}H$ ($r_{^{13}C\text{-}^{1}H}$ ≈ 1 Å) en supposant une paire de spins strictement isolée, la fréquence de rotation doit être de l'ordre de 30 kHz (sinon on ne moyenne que partiellement cette interaction, cela se traduit par l'apparition de bandes de rotation).

### a) Déplacement chimique et anisotropie de déplacement chimique (Chemical Shift Anisotropy *CSA*)

On a, en absence de toute réorientation macroscopique (mode statique),

$$\omega_{CS}(\theta,\phi) = \underbrace{-\omega_0\delta_{iso}}_{\text{Isotrope}} \underbrace{-\frac{1}{2}\omega_0\Delta_{CSA}\{3\cos^2\theta - 1 + \eta_{CSA}\sin^2\theta\cos 2\phi\}}_{\text{Anisotrope}} \quad (2\text{-}20)$$

Termes : Isotrope Anisotrope

avec $\delta_{iso}$ le déplacement chimique isotrope, $\delta_{iso} = \frac{1}{3}(\delta_{XX} + \delta_{YY} + \delta_{ZZ})$ où $\delta_{XX}$, $\delta_{YY}$ et $\delta_{ZZ}$ représentent les valeurs propres dans le repère des axes principaux du tenseur CSA. Dans l'expression ci-dessus, $\omega_{CS}$ est homogène à une pulsation (rad.s$^{-1}$).

$\Delta_{CSA}$ est l'anisotropie de déplacement chimique avec $\Delta_{CSA} = \delta_{ZZ} - \delta_{iso}$

$\eta_{CSA}$ est le paramètre d'asymétrie $\eta_{CSA} = \left|\frac{\delta_{YY} - \delta_{XX}}{\Delta_{CSA}}\right|$ avec les conventions suivantes : $|\delta_{ZZ} - \delta_{iso}| \geq |\delta_{XX} - \delta_{iso}| \geq |\delta_{YY} - \delta_{iso}|$

θ et ϕ determinent la direction de $\mathbf{B_0}$ dans le repère des axes principaux (Figure 2-13).

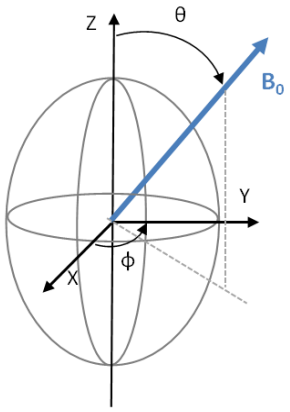



Figure 2-13 : (X Y Z) : repère des axes principaux. Ici le cristallite associé est supposé statique par rapport à $B_0$.

En fréquence « infinie », à un angle ψ donné (orientation du rotor par rapport à $\mathbf{B_0}$),

$$\omega_{CS}(\theta,\phi) = -\omega_0\delta_{iso} + P_2(\cos\psi)f_1(\theta,\phi) \quad (2\text{-}21)$$

Dans l'équation ci-dessus, deux types de composantes sont remarquables : la partie isotrope qui définira le déplacement chimique isotrope indépendant des angles θ et ϕ, et un élargissement résiduel correspondant à une fonction $f_1$(θ, ϕ) modulée par $P_2(\cos\psi)$. Lorsque $\psi$ = 0°, la rotation conduit à un spectre identique au mode statique. Lorsque $\psi = \psi_m$, l'anisotropie est totalement moyennée.

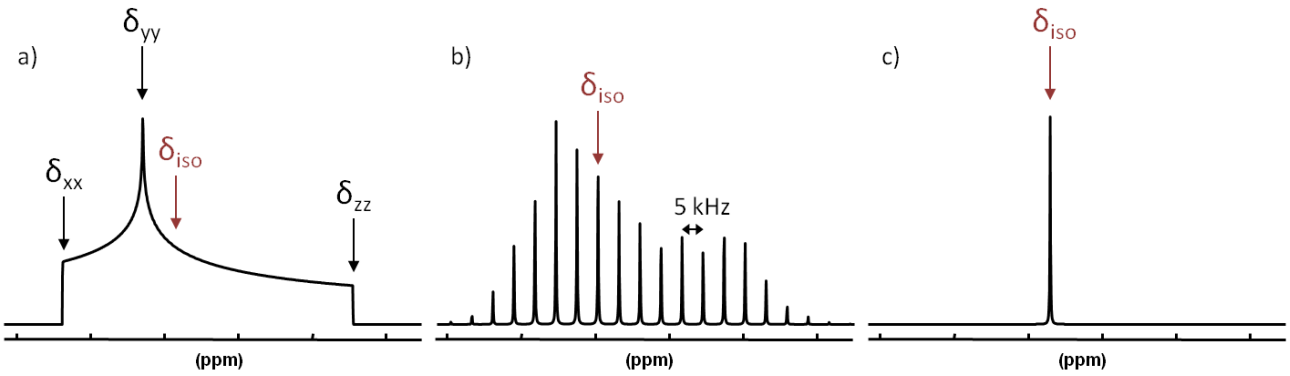



Figure 2-14 : Influence de l'interaction CSA ($\eta_{CSA} \neq 0$) et de la rotation MAS a) Spectre Statique b) MAS 5 kHz c) MAS en « fréquence infinie ».

Mathématiquement, on démontre que les discontinuités de la forme de raie statique correspondent aux valeurs propres, $\delta_{XX}$, $\delta_{YY}$ et $\delta_{ZZ}$ (Figure 2-14a). Pour une fréquence de rotation « infinie », un spectre isotrope est obtenu (Figure 2-14c). Pour une fréquence de rotation comparable à l'anisotropie (Figure 2-14b), on observe une collection de bandes de rotation, répliques de la résonance isotrope. L'analyse des intensités relatives de ces bandes de rotation permet d'évaluer les valeurs propres $\delta_{XX}$, $\delta_{YY}$ et $\delta_{ZZ}$ [13].

### b) Interaction dipolaire directe D

Pour le couplage dipolaire direct hétéronucléaire entre 2 spins i et j, on a :

$$\omega_{\mathrm{D,\ hétéronucléaire}}(\theta) = \omega_0 \pm \frac{1}{2} D_{\mathrm{ij}}(3\cos^2\theta - 1) \tag{2-22}$$

alors que pour le couplage dipolaire direct homonucléaire l'équation devient :

$$\omega_{\mathrm{D,\ homonucléaire}}(\theta) = \omega_0 \pm \frac{3}{4} D_{\mathrm{ij}}(3\cos^2\theta - 1) \tag{2-23}$$

$\omega_D$ est homogène à une pulsation (rad.s$^{-1}$). Comme vu précédemment, le terme isotrope est nul ici. Le terme anisotrope dépend uniquement de l'angle θ entre l'axe de liaison des deux noyaux couplés et le champ magnétique $\mathbf{B_0}$.

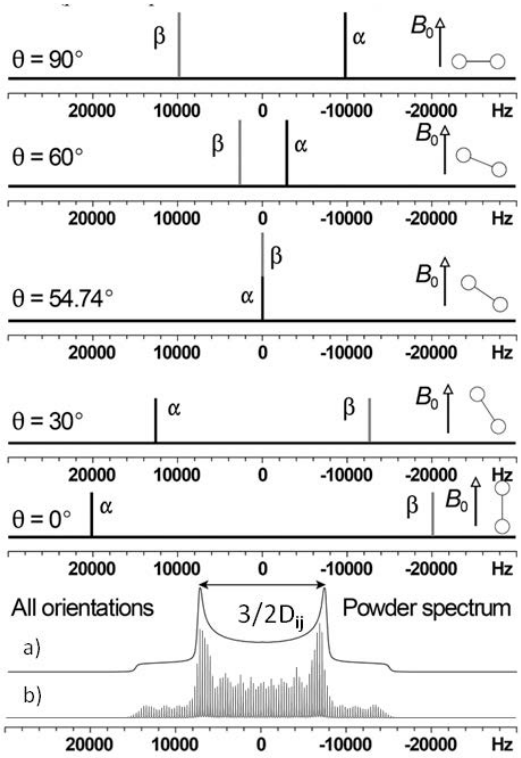



**Figure 2-15 : Influence du couplage dipolaire homonucléaire a) sur le spectre statique et b) en rotation à l'angle magique. Adapté de** [14]**. Ici, on fixe $\nu_0$ = 0 Hz et on suppose une paire de spins strictement isolée.**

Pour un spectre RMN de poudre, on parle alors de doublet de Pake [15] (interaction dipolaire homonucléaire). Il est ensuite aisé de remonter à la distance internucléaire grâce à la distance entre les cornes du doublet (Figure 2-15a). En toute rigueur, l'analyse est simple lorsqu'on prend en compte une paire de spins strictement isolée. La rotation MAS à fréquence modérée (<< $D_{ij}$) conduit à un grand nombre de bandes de rotation (fines, lorsque la paire de spins est considérée comme strictement isolée). En toute rigueur, et pour $\nu_{rot}$ >> $D_{ij}$, une résonance unique sera obtenue.

### c) Interaction quadripolaire

De la même manière que précédemment, la rotation à l'angle magique permet de moyenner, *au moins partiellement*, les effets de l'interaction quadripolaire.

### i. *Interaction quadripolaire au 1er ordre*

Pour un spectre de poudre, en mode statique, on a l'expression suivante :

$$\omega_Q(\theta,\phi) = \frac{3\pi C_Q}{4I(2I-1)}(3\cos^2\theta - 1 + \eta_Q \sin^2\theta \cos 2\phi) \quad (2\text{-}24)$$

Une fois encore, (θ, ϕ) orientent $\mathbf{B_0}$ dans le repère des axes principaux du tenseur de gradient de champ électrique. On remarquera l'analogie mathématique avec l'équation (2-20) (on note bien entendu ici l'absence de composante isotrope).

En mode statique, les positions des raies de résonance dépendent de l'orientation du champ statique $\mathbf{B_0}$ par rapport au repère des axes principaux quadripolaires (angles θ et ϕ). Il en résulte une superposition de raies larges (ST) et d'une raie non élargie (CT) (Figure 2-16a). D'un point de vue mathématique, l'interaction quadripolaire au 1er ordre est moyennée efficacement par MAS. Cependant puisque l'interaction quadripolaire (0,1-30 MHz) est généralement très supérieure aux fréquences de rotation MAS (5-100 kHz), des peignes de bandes de rotation fines correspondant aux transitions satellites sont généralement observés (Figure 2-16b):

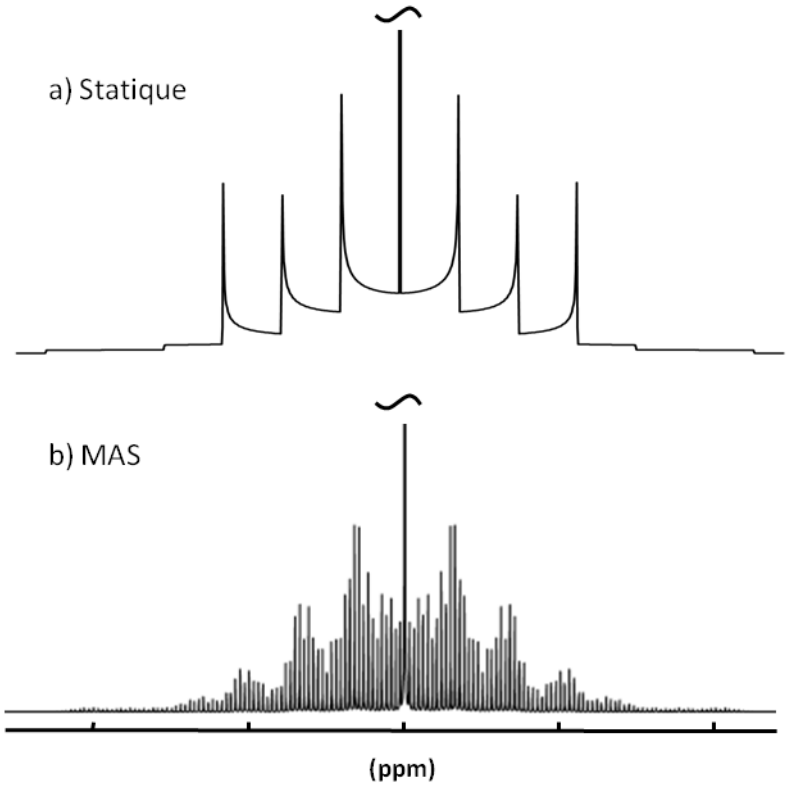



**Figure 2-16 : a) Spectre statique relatif à un noyau de spin I = 7/2 soumis à l'interaction quadripolaire au 1er ordre et $\eta_Q = 0$. b) Spectre MAS correspondant. ($\nu_{rot} << C_Q$).**

### ii. *Interaction quadripolaire au 2nd ordre*

L'effet de la rotation à l'angle magique n'a plus du tout les mêmes conséquences sur l'interaction quadripolaire au 2nd ordre. En effet l'élargissement au second ordre n'est réduit que partiellement par celle-ci. Cela est dû au fait que la pulsation quadripolaire s'écrit alors en rotation à fréquence infinie (pour la CT) comme :

$$\omega_Q(\theta,\phi) = \omega_{iso} + \omega_{iso}^{(2)} + P_2(\cos\psi)f_1(\theta,\Phi) + P_4(\cos\psi)f_2(\theta,\Phi) \quad (2\text{-}25)$$

avec $\omega_{iso}^{(2)}$ le « shift » quadripolaire isotrope, $P_2(\cos\psi)$ et $P_4(\cos\psi)$ les polynômes de Legendre de degrés 2 et 4, soit

$$P_2(\cos\psi) = \frac{3\cos^2\psi - 1}{2} \quad (2\text{-}26)$$

et

$$P_4(\cos\psi) = \frac{35\cos^2\psi - 30\cos^2\psi + 3}{8} \quad (2\text{-}27)$$

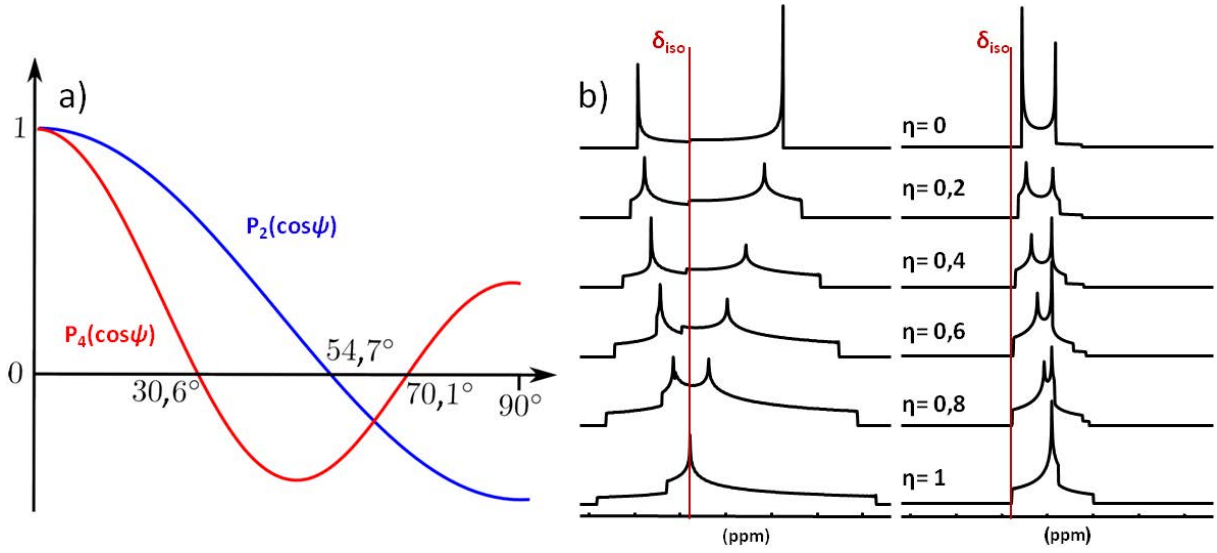



**Figure 2-17 : a) Représentation des polynômes de Legendre $P_2(\cos\psi)$ et $P_4(\cos\psi)$ en fonction de l'angle d'inclinaison ψ du rotor par rapport au champ $B_0$. b) Formes de raie théoriques de la transition centrale en mode statique (à gauche) et en MAS à fréquence infinie (à droite) pour différentes valeurs de $\eta_Q$, CT d'un spin I = 7/2.**

La Figure 2-17 montre qu'on ne peut pas annuler les deux polynômes de Legendre simultanément, d'où le fait qu'il ne soit pas possible de moyenner complètement l'interaction quadripolaire au 2nd ordre avec la technique MAS (ou tout autre rotation de l'échantillon mettant en jeu un *unique* angle macroscopique).

Les techniques telles que DOR (*DOuble Rotation*) [16] ou DAS (*Dynamic Angle Spinning*) [17] permettent quant à elles de moyenner complètement cette interaction au 2nd ordre et d'obtenir ainsi des spectres de haute résolution pour des noyaux quadripolaires. La première technique implique un changement continu d'angle ψ tandis que la seconde utilise une paire d'angles discrets ; ces deux techniques ont pour but de rendre ψ dépendant du temps. Cependant une technique reste plus simple à utiliser pour analyser les noyaux quadripolaires ; la méthode MQMAS (*Multiple-Quantum Magic-Angle spinning*). Proposée en 1995 par Frydman *et coll.* [18], cette séquence d'impulsions utilise les transitions multi-quanta symétriques (3Q, 5Q, 7Q pour I = 7/2) accessibles dans le cas des noyaux quadripolaires et la rotation à l'angle magique pour obtenir également des spectres 2D haute résolution.

### iii. *Le cas spécifique du $^{43}Ca$*

Ce paragraphe sera particulièrement important au cours du Chapitre 3.

Le noyau $^{43}Ca$ est un noyau de spin I = 7/2 avec une abondance naturelle très faible de l'ordre de 0,14 % et un rapport gyromagnétique $\gamma$ de $-1{,}803.10^{7}$ rad.s$^{-1}$.T$^{-1}$. On parle dans ce cas de noyau « bas-$\gamma$ » [10], [19] (fréquence de Larmor : 47,12 MHz sur un spectromètre 16,4 T). Les caractéristiques du $^{43}Ca$ en font donc un noyau intrinsèquement *très peu sensible* du tableau périodique. Avant 2008, on notera d'ailleurs un nombre très limité de publications reportant des résultats $^{43}Ca$ en phase solide tout en soulignant les premiers travaux de Dupree *et coll.* [20], [21]. Laurencin *et coll.* ont contribué à la généralisation de la RMN $^{43}Ca$ MAS [22] à partir de 2008 en tirant parti de différentes approches expérimentales et méthodologiques :

***(i)*** utilisation de composés enrichis en $^{43}Ca$ : il est possible d'utiliser le produit commercial $^{43}\underline{Ca}CO_3$ (calcite) comme précurseur de synthèse. En particulier, à haute température, $^{43}\underline{Ca}CO_3$ peut être transformé en $^{43}\underline{Ca}O$, cet oxyde pouvant alors directement intervenir en tant que réactif en solution aqueuse. Laurencin *et coll.* ont ainsi synthétisé un échantillon d'hydroxyapatite enrichi en $^{43}Ca$ et ont ainsi pu enregistrer la toute première expérience 2D $^{43}Ca$ 3Q MAS [23]. Il a été possible, à haut champ magnétique de séparer les contributions des deux sites Ca1 et Ca2 (voir Chapitre 1 partie 2 a).). Bonhomme *et coll.* [24] ont pu mettre en œuvre des méthodes de type $^{13}C\{^{43}Ca\}$ TRAPDOR à partir d'un échantillon de benzoate de calcium enrichi en $^{43}Ca$.

***(ii)*** RMN à ultra haut champ magnétique : les valeurs de $C_Q$ ($^{43}Ca$) sont généralement faibles (< 3 MHz) (rappelons ici que I = 7/2). Il en résulte que la rotation MAS modérée ($\sim$ 5 kHz) est un outil pertinent (les effets de CSA en $^{43}Ca$ sont faibles, même à ultra haut champ magnétique). Il le sera d'autant plus que $\mathbf{B_0}$ sera élevé, de façon à minimiser les effets d'élargissement quadripolaire au 2$^{nd}$ ordre. Le problème de sensibilité est alors contourné en utilisant des rotors de gros volume (7 ou 9,5 mm) permettant la rotation MAS à 5 kHz. Ainsi, plusieurs travaux récents de la littérature présentent des spectres $^{43}Ca$ en *abondance naturelle* à ultra haut champ magnétique ($\geq$ 20 T, $\geq$ 850 MHz). Des spectres 1D très acceptables en terme de rapport signal/bruit sont obtenus en quelques heures (il s'agit là d'un simple ordre de grandeur). Citons pour exemple les travaux de Bryce *et coll.* [25], [26] sur de la Vatérite et des biomolécules, Laurencin *et coll.* [19], [24] sur de l'hydroxyapatite et Charpentier *et coll.* [27] sur des verres de silicates. Notons que des techniques d'augmentation d'intensité de la transition centrale telle que la DFS (*Double Frequency Sweep*) [28] sont couramment mises en œuvre, conduisant à un gain $\geq$ 2 sur l'intensité des résonances $^{43}Ca$ MAS. A notre connaissance, aucune expérience 2D $^{43}Ca$ n'a pu être enregistrée en *abondance naturelle*. Ce point sera largement commenté au cours du Chapitre 3 lorsque nous aborderons les potentialités de la RMN $^{43}Ca$ **DNP** MAS.

***(iii)*** à partir des travaux de Gervais *et coll.* [29], il est désormais possible de calculer les paramètres RMN $^{43}Ca$ (quadripolaire et CSA) par des méthodes de premiers principes, en utilisant l'approche GIPAW (*Gauge Included Projected Augmented Wave*). Cette méthode de calcul très efficace a été proposée en 2001 par Pickard et Mauri [30]. Nous reviendrons sur ce point particulier au cours de ce Chapitre. Il est évident que la combinaison fructueuse des expériences de RMN $^{43}Ca$ et des calculs *ab initio* a permis de

populariser l'utilisation de la sonde locale $^{43}Ca$ dans le domaine de la cristallographie RMN [31], [32]. En particulier, des corrélations importantes reliant $\delta(^{43}Ca)_{calc}$ et <Ca···O> ont été mises en évidence, aussi bien dans le cas de composés cristallisés que de verres [33](<Ca···O> correspond ici à la moyenne des distances Ca–O du polyèdre de coordination de l'atome de calcium).

d) Ultra hauts champs magnétiques et ultra haute fréquence de rotation MAS

A plus haut champ $\mathbf{B_0}$, les fréquences de Larmor des noyaux seront plus élevées (jusqu'à 23 T, $\nu_1(^1H) \approx 1$ GHz). L'avantage réside dans le gain en résolution et en sensibilité. L'interaction quadripolaire au 2$^{nd}$ ordre sera plus faible, l'interaction CSA plus forte. Il est nécessaire cependant d'avoir à l'esprit certains points relatifs à de telles conditions expérimentales.

À fréquence de rotation plus élevée, les échantillons sont soumis à une augmentation de la température ainsi que de la pression [34]. De telles contraintes internes peuvent être extrêmement problématiques pour des matériaux sensibles voire métastables. Des transformations *in situ* peuvent alors être observées. En connaissance de cause, il est possible de réguler la température à haute vitesse ou au contraire de suivre une transformation en suivant l'évolution de la température *in situ*. En ce qui concerne la pression, Zwanziger *et coll.* [35] proposent une explication aux effets de contraintes dans l'échantillon pendant la rotation. Ils montrent ainsi par l'expérience et le calcul qu'une modification du blindage chimique peut être observable directement. Le diamètre du rotor joue ici un rôle critique (en fonction de la fréquence de rotation) quant à l'augmentation de température et de pression. L'utilisation de rotor de faible diamètre à ultra haute fréquence MAS tend à limiter l'échauffement de l'échantillon. Ces considérations seront à prendre en compte lors de l'étude des oxalates de calcium hydratés (Chapitre 3 partie 1 b).).

## 3. Séquences d'impulsions

Au cours de cette thèse, plusieurs types de séquences d'impulsions dédiées à la RMN en phase solide ont été utilisés. Chacune d'entre elles permet une analyse spécifique et possède ses avantages et inconvénients propres. Une description de l'expérience DNP CP MAS est proposée à la fin de ce Chapitre.

a) *High Power DECoupling* (HPDEC)

Pour un noyau S suffisamment abondant et caractérisé par des temps de relaxation $T_1(S)$ raisonnables, il est courant d'utiliser une acquisition directe du signal S en rotation MAS (de façon à moyenner efficacement l'interaction CSA) (Figure 2-18).

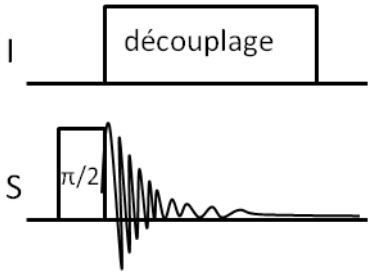



Figure 2-18 : Séquence d'impulsions HPDEC.

Cependant, lors d'une telle acquisition, il se peut qu'un noyau beaucoup plus abondant (I) interagisse par le biais d'interactions dipolaires hétéronucléaires (comme c'est souvent le cas avec le noyau $^{1}H$, noyau abondant, les protons étant fortement couplés entre eux) avec le noyau étudié (S). Il en résulte alors une interaction résiduelle que la rotation rapide à l'angle magique ne peut complètement moyenner aux fréquences accessibles. Il faut dans ce cas appliquer un découplage haute puissance lors de l'acquisition afin de supprimer l'élargissement dipolaire résiduel. Plusieurs types de découplages hétéronucléaires peuvent ainsi être utilisés :

- CW (*Continuous Wave*) : il consiste à irradier de manière continue le noyau I en utilisant un champ RF dont la phase reste invariante.
- TPPM (*Two Pulse Phase-Modulation*) : le schéma de découplage consiste à appliquer des impulsions RF de durée $\tau_P$ et de phase $+\phi/2$ et $-\phi/2$, ces paramètres sont ajustables. [36]
- SPINAL64 (*Small Phase INcrementation ALternation with 64 steps*) : cette séquence correspond à un supercyclage de l'expérience TPPM, le principal paramètre à optimiser étant la durée caractéristique des impulsions de phase donnée [37], [38].

### b) *Cross Polarization* (CP)

On se limite ici à la description de la polarisation croisée lorsque I et S sont caractérisés par des spins ½.

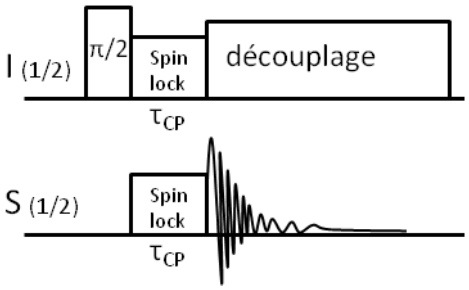



Figure 2-19 : Séquence d'impulsions de polarisation croisée de I (abondant) vers S (peu abondant).

La polarisation croisée est une technique RMN de double résonance impliquant *généralement* un noyau rare (S) et un noyau abondant (I= $^{1}H$, $^{19}F$ …) [39], [40], [41]. On note que la CP peut être fait entre deux noyaux abondants ($^{1}H \rightarrow {}^{31}P$). Elle permet de partiellement résoudre deux inconvénients majeurs de la RMN à l'état solide :

- la faible sensibilité de certains noyaux de par leur faible abondance naturelle (gain théorique = $|\gamma_I|/|\gamma_S|$
- les longs temps de relaxation longitudinale en RMN du solide ($T_1(^{1}H) << T_1(S)$ en général).

Comme le montre la Figure 2-19, une impulsion π/2 est effectuée sur la voie I = $^{1}$H suivie d'une étape de spinlock ($\tau_{CP}$) sur les deux voies I et S ($\tau_{CP}$ correspond au temps de contact). Cela permet de transférer une partie de la polarisation de I vers le noyau S. Ce transfert CP ne sera efficace qu'en vérifiant une condition de résonance dans un repère doublement tournant. Il s'agit de la condition de Hartmann-Hahn [42] :

$$|\omega_S| = |\omega_I| \Rightarrow |\gamma_S| B_1(S) = |\gamma_I| B_1(I) \quad (2\text{-}28)$$

L'équation (2-28) correspond au mode statique.

On notera qu'en rotation MAS, la condition de Hartmann-Hahn est modifiée, on a alors :

$$|\omega_S| = |\omega_I| \pm n\omega_{rot} \quad (2\text{-}29)$$

avec $n = 1, 2$ et $\omega_{rot}$ correspond à la pulsation MAS (en rad.s$^{-1}$).

L'acquisition est effectuée à l'aide d'un découplage haute puissance pour supprimer l'élargissement dipolaire hétéronucléaire résiduel. Il faut cependant trouver un bon compromis entre $\tau_{CP}$ et le temps de relaxation dans le repère tournant ($T_{1\rho}$) afin de ne pas trop perdre de signal pendant le temps de contact.

La séquence CP ne permet pas au premier abord d'effectuer des mesures quantitatives sur les signaux obtenus du fait de la variation de l'interaction dipolaire hétéronucléaire $^{1}$H–S d'un site à un autre et de la présence éventuelle de mouvements locaux (dynamique locale) tendant à moyenner au moins partiellement l'interaction dipolaire I–S. Il convient également de signaler que pour une expérience CP MAS, les conditions de Hartmann-Hahn seront plus étroites et de ce fait plus difficiles à trouver et à optimiser [43]–[45]. En rotation MAS, l'utilisation de rampes, lors de l'étape de spinlock [46] est recommandée de façon à élargir la condition de Hartmann-Hahn.

Il est possible d'effectuer une double polarisation croisée, le principe restant le même : un transfert d'aimantation est effectué entre un spin abondant I vers un spin S mais au lieu d'enregistrer le signal immédiatement, un autre transfert d'aimantation est effectué vers un autre spin. Cette méthode permet : ***(i)*** de filtrer le signal obtenu par un hétéronoyau et ***(ii)*** de déterminer les connectivités entre spins peu abondants grâce à des expériences à $\tau_{CP}$ variable. Pour maintenir la sensibilité de l'expérience, il est nécessaire de régler très précisément les conditions de Hartmann-Hahn lors des deux transferts successifs.

### c) *HETeronuclear CORrelation* (HETCOR) et *Decoupling Using Mind-Boggling Optimization* (DUMBO)

L'expérience HETCOR est une variante à deux dimensions de l'expérience de polarisation croisée. La conception de la séquence est strictement la même, si ce n'est qu'un délai est introduit après l'impulsion π/2 sur (I) afin de coder l'évolution de l'aimantation du noyau abondant. Une double Transformée de Fourier permet d'obtenir des corrélations de type dipolaire entre les deux dimensions $\omega_I$ et $\omega_S$.

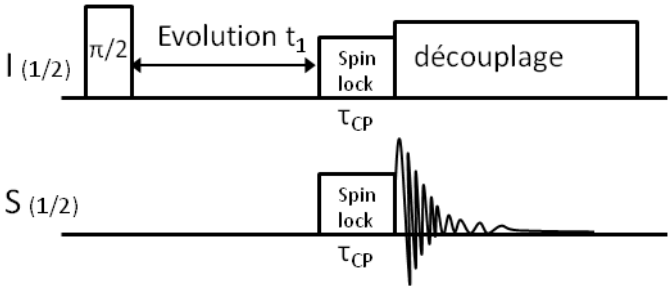



Figure 2-20 : Séquence d'impulsions HETCOR.

Il est possible de combiner l'expérience HETCOR avec des techniques de découplage homonucléaire durant l'évolution en $t_1$ de l'expérience. Une telle approche permet d'augmenter sensiblement la résolution sur la voie indirecte I ($^1$H). Le découplage DUMBO (*Decoupling Using Mind-Boggling Optimization*) est un bon exemple [47], [48]. Il est fondé sur une modulation de phase continue, permettant de s'adapter au système de spins. Cependant la rotation à l'angle magique doit rester modérée afin que le découplage soit pleinement efficace (~ 12 kHz).

Il est possible également d'utiliser la rotation ultra-fast MAS (100 kHz) de façon à obtenir directement une résolution raisonnable sur la voie $^1$H. L'établissement de la condition de Hartmann-Hahn nécessite alors des réglages précis.

### d) Saturation-récupération

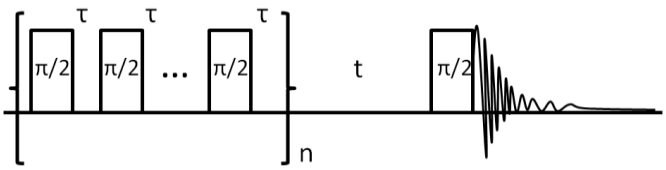



Figure 2-21 : Séquence d'impulsions saturation-récupération.

La séquence de saturation-récupération permet de mesurer $T_1$ pour un noyau S. La séquence d'impulsions (Figure 2-21) est composée d'un train d'impulsions π/2 (saturation permettant d'atteindre un état initial à aimantation nulle) suivi d'une impulsion π/2 après un délai t de récupération. Cette dernière impulsion π/2 permet la lecture de l'aimantation récupérée le long de l'axe z ($\mathbf{B_0}$) durant t, $M_Z(t)$. L'évolution de $M_Z$ en fonction de t est donnée par :

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \qquad (2\text{-}30)$$

## 4. *Dynamic Nuclear Polarization* (DNP)

Le problème dont souffre principalement la spectroscopie RMN est son manque de *sensibilité*. Depuis plusieurs décennies, les chercheurs en RMN ont constamment lutté contre ce déficit de sensibilité et ont inventé des méthodes particulièrement originales pour contourner (au moins partiellement) ce problème fondamental. Les progrès observés ont concerné tout autant l'instrumentation propre à l'expérience RMN, la méthodologie des impulsions et le traitement du signal. Citons pour exemples :

***(i)*** Utilisation généralisée de la Transformée de Fourier de signaux temporels [49]

***(ii)*** RMN à ultra haut champ magnétique $\mathbf{B_0}$ (~ 25 T)

***(iii)*** Transfert de polarisation de type INEPT et DEPT [50], [51]

***(iv)*** Transfert de polarisation de type CP [39], [42]

***(v)*** Détection indirecte [52]

***(vi)*** Utilisation de sondes type cryo-sonde [53], [54]

***(vii)*** Expériences MAS à température très faible (T << 40 K) [55]

***(viii)*** Hyperpolarisation : $^{129}$Xe [56], para-hydrogène [57], CINDP…

Cette liste n'est bien sûr pas exhaustive. En particulier, nous n'évoquons pas ici les méthodes plus exotiques de détection de la RMN, optiques et mécaniques [58].

Cette très faible sensibilité est due principalement à la très faible polarisation des spins nucléaires (à température ambiante), et ce, malgré l'utilisation de champs magnétiques $\mathbf{B_0}$ de plus en plus intenses ($\mathbf{B_0}$ ≈ 23,5 T actuellement $\nu_0(^1H)$ = 1 GHz). Plusieurs méthodes ont été proposées afin de contourner ce problème. Nous nous intéressons ici à l'une d'elles : la polarisation nucléaire dynamique ou *Dynamic Nuclear Polarization* (DNP). La DNP connait un intérêt croissant depuis quelques années aussi bien en chimie des matériaux inorganiques ou d'intérêt biologique) qu'en catalyse ou biochimie (voir Figure 2-22).

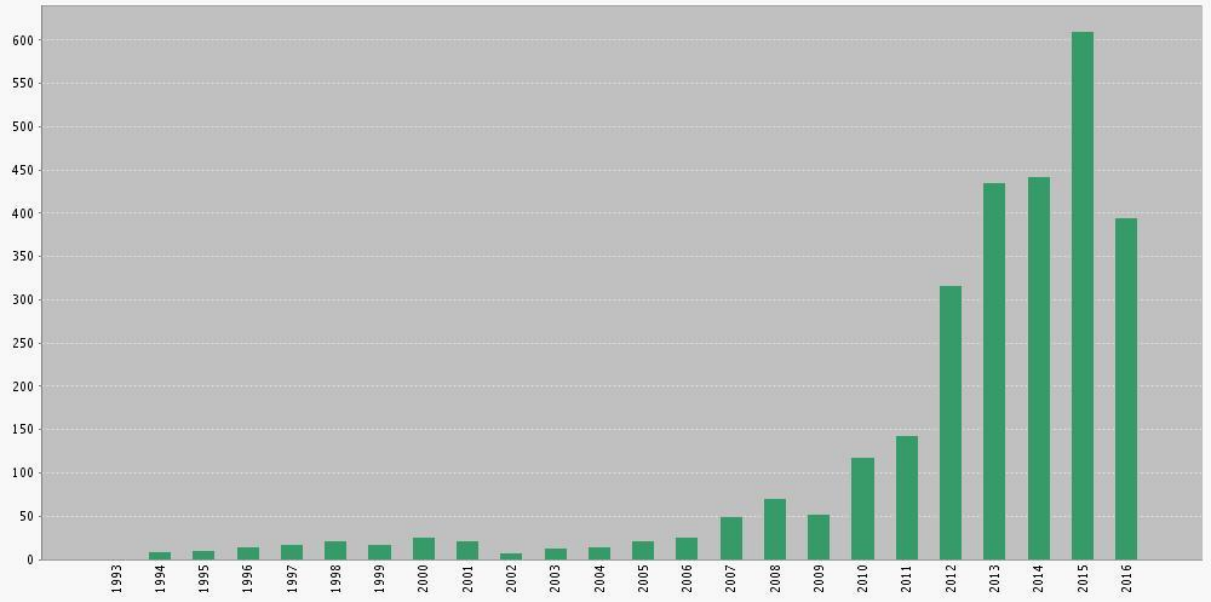



**Figure 2-22 : Nombre de citations de journaux pour le mot-clef « MAS DNP » par an (données Web of science) (25/07/16).**

La DNP permet d'augmenter la sensibilité de la RMN à l'état solide (mais aussi à l'état liquide) par un facteur théorique de ~660 pour la $^{1}H$ RMN ce qui équivaut en temps à un facteur de $660^2$ (> 435000)! Ce facteur 660 correspond environ à $|\gamma_{e^-}| / \gamma_{^1H}$. En pratique, la technique repose sur la saturation de la raie de résonance paramagnétique électronique (RPE) d'électrons non appariés (radical ou biradical ajouté dans le milieu) par irradiation micro-onde, suivi d'un transfert de polarisation vers les spins nucléaires du matériau d'intérêt. En d'autres termes, la DNP met en jeu le transfert de la très forte polarisation électronique. Tout cela à très basse température (~ 100 K).

### a) Bref historique

La théorie de la DNP a été proposée par Overhauser [59], au début des années 50 et directement observée par Carver et Slichter dans du lithium métallique [60]. Quelques expériences ont été conduites en solution dans les années suivantes avec succès [61]–[63]. Les premières expériences de DNP en rotation MAS ont été proposées dès 1985 par Wind [64] et Schaefer [65] dans le cadre de l'étude de charbons et de polycarbonates. Toutes ces expériences ont été conduites à bas champs magnétiques $\mathbf{B_0}$ (fréquence de Larmor du proton 60 MHz). L'extension couronnée de succès de la méthode DNP à des champs magnétiques $\mathbf{B_0}$ beaucoup plus élevés (aujourd'hui ~ 19 T) est principalement attribuée aux travaux pionniers de Griffin *et coll.* au MIT [54], [66]. Citons tout particulièrement l'utilisation de gyrotrons à haute fréquence et délivrant de fortes puissances MW (microondes), le design de sondes MAS cryogéniques de très bonne qualité [53], [54], la mise sur le marché d'un spectromètre DNP MAS commercial (voir Figure 2-23) [67], [68]. Depuis 1993, les expériences DNP MAS se sont généralisées au sein de la communauté des RMNistes du solide (nous n'abordons pas ici le DNP par dissolution [69]). Les axes de recherche sont multiples : ***(i)*** design de nouveaux radicaux [70], [71], ***(ii)*** instrumentation à très basse température (voir les travaux du groupe de G. De Paëpe au CEA, Grenoble), ***(iii)*** approche théorique des mécanismes de transfert DNP [72], [73], ***(iv)*** applications à des systèmes d'intérêt biologique, incluant des membranes et des protéines membranaires [74], [75], applications en science des matériaux : composés mésoporeux, hybrides organiques-inorganiques [76].

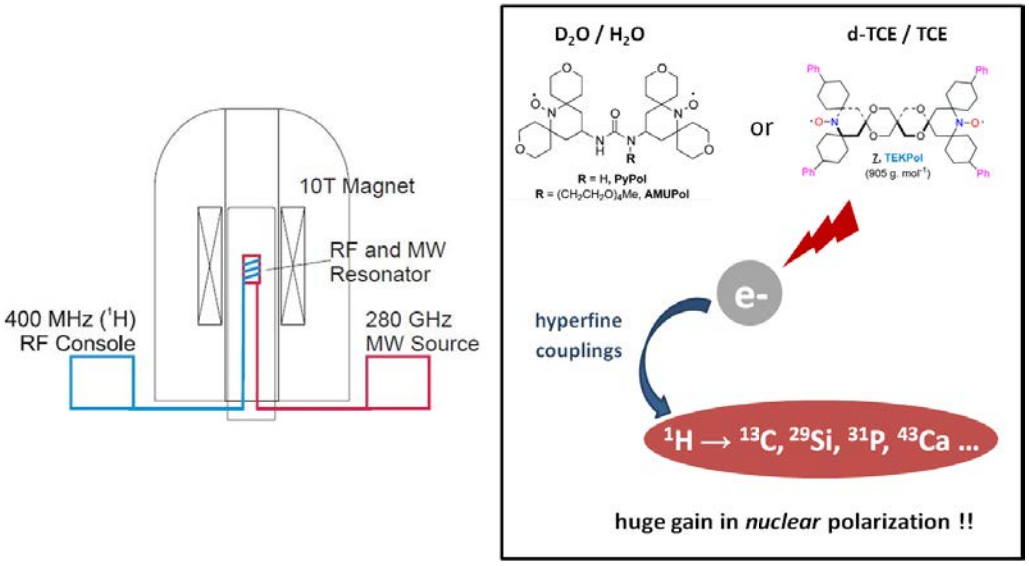



**Figure 2-23: Principe schématisé de la méthode DNP, instrumentation et schéma de transfert $e^- \rightarrow n$.**

En science des matériaux, nous mentionnons tout particulièrement l'article de Emsley *et coll.* [77], de 2010, démontrant des gains DNP impressionnants (~ 400) dans le cadre de l'étude de matériaux mésoporeux de type MCM 41 ($^{13}C$, $^{21}Si$). Notons que cet article a relancé un engouement énorme en ce qui concerne les expériences DNP.

### b) Eléments de théorie

Au cours de l'expérience DNP, plusieurs mécanismes de transfert peuvent intervenir. Nous les décrivons brièvement ci-dessous.

#### *i. L'effet Overhauser (OE) (Figure 2-24)[59]*

Cet effet, à la base de la théorie de la DNP, prédit qu'un transfert de polarisation peut se produire, dans un solide, entre les spins électroniques de la bande de conduction et le noyau d'un métal ou en solution. Il s'agit ici d'OE « traditionnel ». L'irradiation microonde à $\omega_{0e}$ et la modulation stochastique des interactions ($e^-$–n) due aux mouvements conduit à un phénomène de relaxation croisée et d'hyperpolarisation des niveaux nucléaires. Très récemment, Can *et coll.* ont montré qu'un OE pouvait également être observé dans le cas de solides isolants [78]. Il s'agit d'un résultat assez surprenant qui provient également d'un processus stochastique impliquant la modulation de l'interaction hyperfine ($e^-$–n) par la délocalisation des spins des électrons non appariés du radical. La prise en compte de ce mécanisme particulier de transfert DNP apparait prometteuse à très haut champ magnétique (18,2 T)

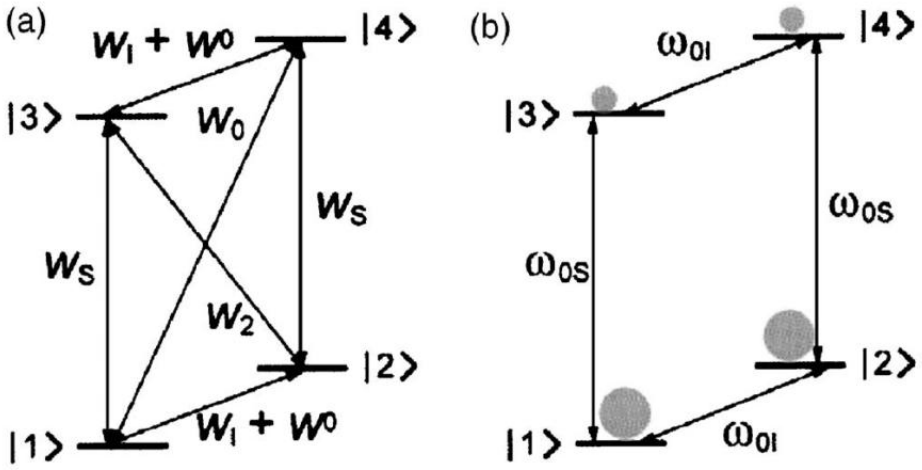



**Figure 2-24: Diagramme d'énergies impliqué dans l'effet Overhauser. (a) vitesses de transitions importantes pour l'OE. (b) Population à l'équilibre thermique pour un système de spins à deux niveaux. La population de spin est représentée schématiquement en gris. D'après** [79]**.**

Ici, les transitions sont dites autorisées (transitions électroniques simple quanta), la saturation est donc très facile à obtenir et nécessite moins de puissance d'irradiation que dans les effets décrits ci-après.

#### *ii. L'effet solide ou Solid-Effect (SE) (Figure 2-25) [80], [81]*

Décrit par Abragam [6] (Chapitre IX, partie III, B.), l'effet solide se déroule dans des conditions particulières de RPE et peut être modélisé par un système à deux spins (un électron et un noyau). La présence d'un radical peu anisotrope conduit à une largeur de raies RPE (Δ) qui doit être beaucoup

plus faible que la fréquence de Larmor nucléaire $\omega_{0n}$ (*i.e.* $\Delta << \omega_{0n}$). L'irradiation micro-onde à la somme ou à la différence de $\omega_{0e}$ et $\omega_{0n}$ ($|\omega_{0e} \pm \omega_{0n}|$) permet d'induire des transitions zéro et double quanta interdites (dans le cas d'un électron couplé à un noyau). A l'issue de la saturation, il en résulte une augmentation significative de la polarisation nucléaire.

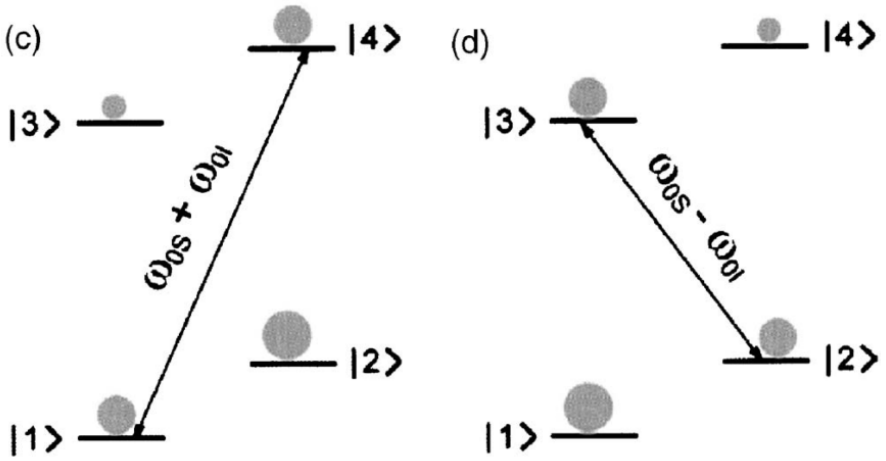



**Figure 2-25: Diagramme d'énergies impliqués dans le SE. (c) et (d) La saturation des transitions interdites zéro- et double quanta conduit à une valeur positive ou négative par le SE. D'après** [79]**.**

### *iii. Cross-Effect (CE) [13,14]*

Lorsque $\Delta > \omega_n$, il faut alors utiliser un biradical présentant un couplage dipolaire électron-électron fort : le *cross-effect* domine. Dans ce cas, il faut envisager un système à trois spins, impliquant deux spins électroniques couplés par l'interaction dipolaire et un spin nucléaire. L'équilibre de polarisation à l'aide d'une irradiation à $\omega_{0e1}$ ou $\omega_{0e2}$ aura lieu, lorsque la différence de fréquence RPE des deux électrons correspond à la fréquence de Larmor nucléaire ($|\omega_{0e1} - \omega_{0e2}| = |\omega_{0n}|$). En théorie, un système idéal serait d'avoir deux fréquences de Larmor électroniques fines séparées par $\omega_{0n}$. Pratiquement, un radical possédant une largeur de raie inhomogène plus grande que la fréquence de Larmor du noyau suffit.

Le *cross-effect* est largement mis à contribution dans les expériences récentes de DNP MAS. Il s'agit du mécanisme impliqué dans toutes nos expériences à venir. A ce stade, nous notons que les temps de relaxation $T_1$ électronique et nucléaire vérifient $T_{1e} << T_{1n}$. En présence de $T_{1e}$ trop faibles, la saturation des transitions électroniques sera largement incomplète. Il faut donc trouver des radicaux caractéristiques pour des valeurs $T_{1e}$ compatibles avec l'hyperpolarisation des spins nucléaires.

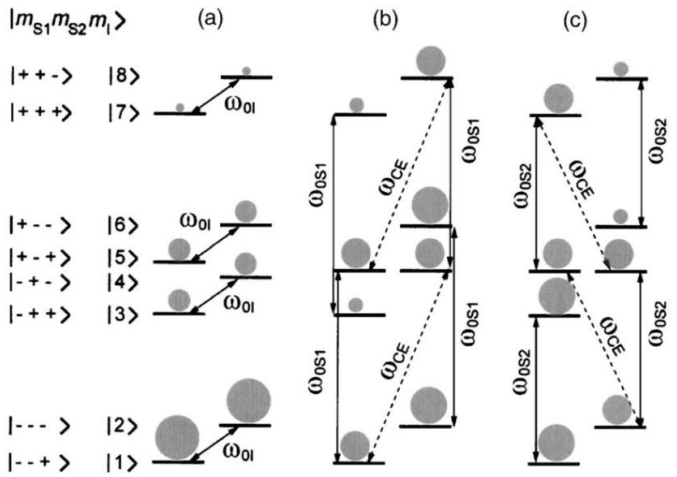



**Figure 2-26: Diagramme d'énergies impliqués dans le CE, d'après** [79]**.(a) Distribution de population à l'équilibre thermique pour un système à trois spins. (b) la saturation de la transition RPE permise pour un des électrons dipolaires couplés ($\omega_{0S1}$) mène à un gain négatif. (c) La saturation de la transition correspondant au second électron ($\omega_{0S2}$) mène à un gain positif.**

#### *iv. Mélange Thermique ou Thermal Mixing (TM) [83], [84]*

Largement décrit par Goldman, cet effet ne sera pas pris en compte ici du fait ***: (i)*** des hauts champs magnétiques utilisés ($\mathbf{B_0}$), ***(ii)*** de la faible concentration en radicaux utilisée dans la plupart des expériences DNP MAS.

### c) Tendances actuelles de la DNP MAS

Les travaux pionniers en DNP concernaient les métaux [59] : lithium métallique, sodium métallique, et sodium dissous dans de l'ammoniac liquide anhydre [60]. Par la suite, Duijvestijn a pu analyser du diamant par l'effet solide (SE), grâce aux défauts azotés dans la structure [85]. L'utilisation de radicaux (biradicaux) exogènes est désormais classique dans l'expérience DNP MAS (ou CP MAS) à haut champ magnétique (le CE est alors privilégié).

Le gain en signal et en temps de l'expérience est une aubaine pour bon nombre de biologistes et de biochimistes. La DNP se prête particulièrement bien à la biochimie structurale et permet d'obtenir très rapidement, avec une sensibilité de plus en plus poussée, des spectres 2D de corrélations $^{1}H–^{13}C$ et $^{13}C–^{15}N$ en *abondance naturelle* [86] ! La RMN des macromolécules biologiques a déjà été récompensée par le Prix Nobel de chimie de Kurt Wüthrich en 2002 : la DNP devrait permettre d'aller encore plus loin en permettant la résolution de bons nombres de structures protéiques. Il faut également garder en mémoire qu'il s'agit d'une technique de surface [18,19] (SENS : *Surface Enhanced NMR Spectroscopy*). Elle permet donc *a priori* de sonder spécifiquement différents types d'interfaces organiques/biologiques/inorganiques. Citons pour exemples : ***(i)*** l'interface collagène-apatite, ***(ii)*** la réaction de molécules en surface de nanoparticules présentés dans des catalyseurs. Kobayashi étudie ainsi des nanoparticules de palladium [88]. Gutman étudie l'action d'un catalyseur au rhodium à l'aide de spectres $^{1}H \rightarrow {}^{15}N$ DNP CP MAS en *abondance naturelle* [89].

De nombreux développements actuels concernent l'instrumentation et les techniques de DNP. Récemment Mathies a présenté une technique de DNP *pulsée* à l'aide de triradicaux permettant le verrouillage des spins électroniques [90]. Tycko développe sur des expériences à très basse

température [91]. La DNP s'oriente également vers des mesures à plus hauts champs magnétiques (800 MHz / 527 GHz) pour lesquels la résolution sera supérieure [92]. Les effets de dépolarisation ont été bien décrits par Thurber *et coll.* [93]et Griffin *et coll.* [94].

### d) Méthodologie et préparation des échantillons

Un des éléments clés de la réussite de la DNP est la préparation de l'échantillon et *a fortiori* le choix d'un couple {radical/solvant} adéquat. Il existe toute une gamme de radicaux. Le processus de transfert recherché à au champ magnétique étant le CE, une attention particulière a été portée sur des biradicaux [95] (voir Figure 2-27).

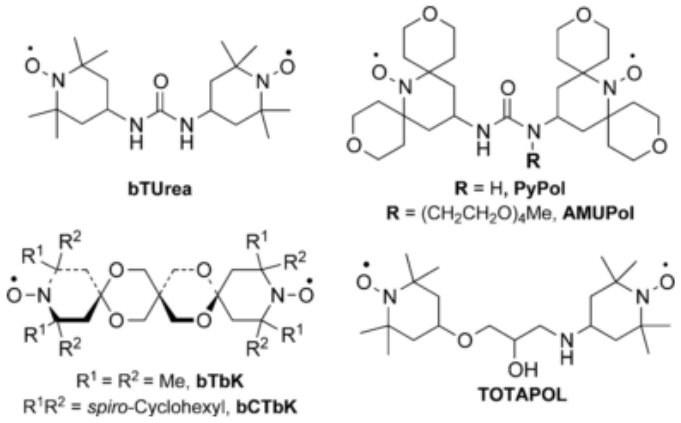



**Figure 2-27 : Structure de différents biradicaux couramment utilisés en DNP MAS, d'après [79].**

Ainsi Zagdoun *et coll.* ont pu tester différentes combinaisons {radical/solvant} [71] pour des solvants non-aqueux, et déduire l'affinité du solvant pour une surface donnée (ici de la silice hybride) par la mesure des gains DNP ($\varepsilon_{Si}$ et $\varepsilon_H$) (voir Tableau 2-3). Ici $\varepsilon$ correspond au rapport des intensités obtenues lors de deux expériences, l'une en présence de MW (ON) et l'autre en l'absence de MW (OFF). La combinaison {radical/solvant} est appelé parfois « DNP juice » dans la communauté.

| Category[a] | Solvent | $\varepsilon_{Si}$[b] | $\varepsilon_H$[b] |
|---|---|---|---|
| 1 | Chloroform | 10 | 16 |
| | 1,1,2,2-Tetrachloroethane | 18 | 21 |
| | *trans*-Dichloroethene | 8 | 9 |
| | 1,2-Dichlorobenzene | 16 | 19 |
| | 1,2-Dichloroethane | 18 | 23 |
| | 1,2-Dibromoethane | 11 | 11 |
| | 1,3-Dibromobutane | 12 | 19 |
| | 1,1,2,2-Tetrabromoethane | 14 | 12 |
| 2 | Hexafluoropropan-2-ol | 9 | 6 |
| | 2,2,2-Trifluoroethanol | 7 | 5 |
| | Isopropanol | 7 | 6 |
| | Mesitylene | 5 | 6 |
| 3 | Tetrahydrofuran | 1 | 4 |
| 4 | Methyl-ter butylether (MTBE) | 1 | 3 |
| | Dimethylformamide (DMF) | 3 | 3 |
| | Dimethylsulfoxide (DMSO) | 4 | 4 |
| | Acetonitrile | 7 | 5 |
| | 1,1,1-Trichloroethane | 3 | 3 |
| 5 | Dichloroethane | 3 | 9 |

**Tableau 2-3 : gains $^{1}H$ et $^{29}Si$ mesurés pour une surface de silice imprégnée par une solution (10 mM) de bTbK dans différents solvants. D'après [68].**

La concentration en biradical dans le « DNP juice » est un paramètre essentiel. En effet il faut moduler celle-ci de façon à obtenir un gain DNP conséquent tout en évitant les effets de *quenching* [94] qui tendent à faire diminuer ε.

La technique la plus communément utilisée est celle dite **d'imprégnation** [96]. Elle consiste simplement à déposer un petit volume (~ 15 µL) d'une solution {biradical/solvant} préparée au préalable, sur l'échantillon de poudre. Cette étape, aussi simple soit-elle, détermine grandement la réussite de l'expérience. A la fin de l'étape d'imprégnation, il ne faut pas obtenir de pâte visqueuse (à ce stade, il est encore très difficile de quantifier plus en avant cette étape). Cette technique, développée initialement pour les matériaux poreux, permet d'imprégner ceux-ci avec un minimum de solution permettant de remplir le volume poreux. Elle offre plusieurs avantages : elle est extrêmement simple, facilement répétable, permet un mouillage uniforme de la surface des grains de la poudre, assure une augmentation minimale du volume de l'échantillon et évite de réduite sa « concentration » [87].

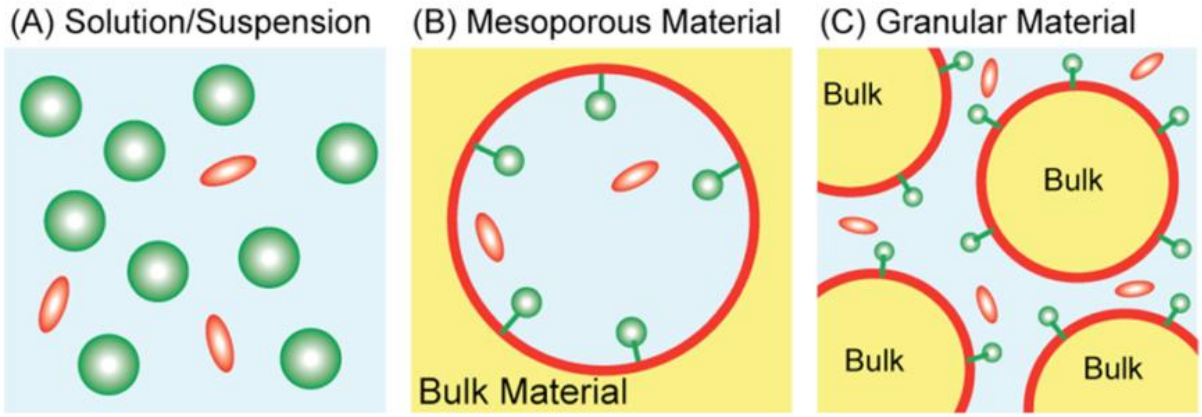



**Figure 2-28 : Schéma de procédés pour introduire des radicaux stables dans les systèmes pour des expériences de DNP RMN à l'état solide. Les sphères vertes représentent les cibles, les lignes rouges indiquent les surfaces qui peuvent être polarisées, les ellipsoïdes rouges représentent les biradicaux stables, le fond bleu représente une matrice organique (solvant), et le jaune représente le matériau de base qui n'est généralement pas polarisé. (A) solution « bulk ». (B) Imprégnation d'un matériau poreux. (C) un matériau granulaire / non poreux. Les deux techniques présentées sur (B) et (C) sont utilisées pour la DNP SENS. D'après** [87].

Dans le Chapitre 3 partie 3 d)., nous présentons des résultats d'expériences DNP préparées suivant ce protocole mais avec l'utilisation de glycérol. Ce dernier est généralement utilisé en tant que cryo-protectant, pour rappel l'expérience se déroule à ~ 100 K. On peut mentionner le fait qu'il existe d'autres techniques de préparation d'échantillons qui sont débattues dans la littérature [97].

### e) Avantages et inconvénients de l'expérience DNP

L'avantage principal est bien évidement le gain en signal qui correspond à un gain considérable en temps de l'expérience. Ce gain peut atteindre plusieurs ordres de grandeur. Le gain théorique en proton est de 660 ($|\gamma_e| / \gamma_{^1H}$). En pratique un ε de l'ordre de 20 correspond (tout de même) à une expérience 400 fois plus rapide ! Comme évoqué précédemment il s'agit avant tout d'une technique de surface, permettant de sonder des nanoparticules greffées, des interfaces voire des catalyseurs.

Bien que pouvant s'appliquer directement au noyau d'intérêt, on parle alors de DNP *directe*, l'expérience la plus simple, usitée actuellement, implique une première hyperpolarisation des

protons de l'échantillon suivie d'un transfert de polarisation des protons vers les noyaux d'intérêt, magnétiquement actifs.

Une question largement débattue dans la littérature est le gain véritable qu'offre la DNP [98]. Comparées à une expérience classique, les conditions de la DNP mettent en jeu un grand jeu de paramètres pouvant grandement influencer son efficacité. Le « rapport de sensibilité absolue » (ASR : *Absolute Sensitivity Ratio*) permet d'estimer un gain effectif plus proche de la réalité qu'une simple comparaison MW ON / MW OFF donnée par ε.

$$ASR = \varepsilon_{\mathrm{DNP}} \times \varepsilon_{\mathrm{T}} \times \eta_{\mathrm{T1}} \times \chi_{\mathrm{bleach}} \times \chi_{\mathrm{weight}} \times \chi_{\mathrm{LW}} \times \chi_{\mathrm{seq}} \times \chi_{\mathrm{ex}} \quad (2\text{-}31)$$

avec $\varepsilon_{\mathrm{DNP}}$, le coefficient de gain standard (MW ON/MW OFF) cité ci-dessus

$\varepsilon_{\mathrm{T}}$, le gain obtenu à basse température (réduction du bruit thermique et augmentation de la polarisation de Boltzmann) ($\varepsilon_{\mathrm{T}} \sim 3$ à 100 K)

$\eta_{\mathrm{T1}}=\sqrt{\frac{T_{1,\mathrm{RT}}}{\tau_{\mathrm{DNP}}}}$ , avec $T_{1,\mathrm{RT}}$ le temps de relaxation longitudinal à $\mathrm{T_{amb}}$ et $\tau_{\mathrm{DNP}}$, la constante de temps caractéristique du build-up du signal DNP

$\chi_{\mathrm{bleach}}$, le facteur de "bleaching" causé par les effets paramagnétiques des biradicaux

$\chi_{\mathrm{weight}}$, le rapport des masses d'échantillon, tenant compte de la quantité de matériau d'intérêt dans les deux expériences

$\chi_{\mathrm{LW}}$, le rapport des largeurs de raies entre les deux expériences

$\chi_{\mathrm{seq}}$, le rapport de la magnétisation efficace après les délais au cours de la séquence d'impulsions, telles que des temps de mélange et temps de contact de CP

$\chi_{\mathrm{ex}}$, le facteur prenant en compte des modifications « extérieurs », s'il y en a (changement de sonde, de champ magnétique, *etc.*).

Il est parfois délicat de mesurer précisément l'ASR entre deux expériences données sachant qu'un grand nombre de paramètres interviennent dans son expression.

En conclusion de cette très brève introduction à l'expérience DNP MAS, nous retenons les points suivants :

- ***(i)*** Depuis 2010 et la contribution d'Emsley et coll. [77], l'expérience DNP a largement influencé la communauté en RMN et science des matériaux. Les expériences que nous présenterons dans la suite de ce manuscrit ont été effectuées à 400 MHz / 263 GHz à ~ 100 K (de façon à optimiser les valeurs de $T_{1e}$) et en rotation MAS à 8 kHz.
- ***(ii)*** Le choix des radicaux s'est porté sur des biradicaux, tels que TOTApol, AMUpol et TEKpol. Du point de vue de l'expérimentateur, la préparation de l'échantillon mettant en jeu le couple {radical/solvant} est fondamentale… mais reste largement empirique.
- ***(iii)*** L'utilisation de biradicaux à 400 MHz / 263 GHz implique que le « *cross-effect* » sera le mécanisme prépondérant du transfert DNP.

***(iv)*** Nous avons systématiquement utilisé l'expérience DNP ***CP*** MAS, mettant en jeu l'hyperpolarisation initiale des protons du matériau considéré suivie du transfert de polarisation vers les noyaux $^{13}C$, $^{23}Na$, $^{31}P$ et $^{43}Ca$ (expériences 1D et 2D, homo- et hétéronucléaires). La diffusion de spins $^{1}H$–$^{1}H$ intervient ici donc à deux niveaux distincts (CP et diffusion de spins).

***(v)*** En tant que chimiste des matériaux et utilisateurs de la DNP CP MAS, il est nécessaire de garder à l'esprit certains points qui peuvent s'avérer être délicats lors de l'interprétation des résultats. Tout d'abord, n'oublions pas que toutes les expériences ont lieu à basse température (100 K). Une telle température n'est pas anodine. En dehors même des transformations de phase, il est possible d'induire des modifications structurales qu'il est nécessaire de prendre en compte (par exemple lorsque nous comparerons les données expérimentales et les prédictions calculatoires obtenues par méthode GIPAW. Un autre problème beaucoup plus complexe concerne l'étude par DNP de nanocomposites organiques-inorganiques. Dans ce cas, plusieurs questions peuvent être soulevées : un unique couple {radical/solvant} assurera-t-il un effet DNP notable sur les deux composantes, organiques et inorganiques ? Comment appréhender la quantification des spectres dans le cas d'$\varepsilon_{DNP}$ différents pour les deux composantes ?

## 5. Calculs *ab initio* de paramètres RMN.

Une étude théorique au moyen de calculs *ab initio* a été effectuée en parallèle de nos travaux expérimentaux. Nous avons en particulier combiné une approche théorique et expérimentale pour interpréter complètement les signatures $^{1}H$ et $^{13}C$ de l'oxalate de calcium monohydraté (Chapitre 3 partie 4 b).). Dans cette partie, nous revenons rapidement sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) en expliquant quelques notions fondamentales. Nous exposerons par la suite les différentes approximations faites et nous les justifierons. Finalement, nous verrons l'utilisation de la DFT au travers de la méthode GIPAW [30], [33], [99].

### a) Théorie de la fonctionnelle de la densité

Le point de départ des calculs de structure électronique est l'équation électronique non relativiste de Schrödinger dans l'approximation de Born-Oppenheimer (le mouvement des électrons est dissocié de celui des noyaux car ces derniers sont considérés comme beaucoup plus lents et donc fixes) :

$$\widehat{H}\psi(\vec{r}1,\dots,\vec{r}N) = E\psi(\vec{r}1,\dots,\vec{r}N) \qquad (2\text{-}32)$$

avec $\widehat{H}$ l'Hamiltonien du système qui est un opérateur, $\psi$ la fonction propre associée à $\widehat{H}$ qui dépend des coordonnées électroniques $\vec{r}\mathrm{i}$ et $E$ l'énergie totale du système.

Résoudre cette équation nous ramène, en théorie, à déterminer les propriétés électroniques d'un système à *N* électrons. Cependant, du fait des interactions entre électrons, cette équation est trop compliquée pour être soluble exactement. Il convient dès lors d'effectuer des approximations afin de pouvoir la résoudre et c'est ce que propose la DFT (Density Functional Theory)[100]. En lieu et place de la fonction d'ondes à *N* électrons $\psi(r_1,\dots,r_N)$ la DFT utilise la densité électronique $n(\vec{r})$ comme descripteur [100]. Les équations de Kohn-Sham permettent de nous placer dans un système

fictif de *N* électrons n'interagissant pas entre eux et ayant la même densité électronique que le système réel. La fonctionnelle de la densité peut alors s'écrire sous la forme d'une somme des énergies du système tel que :

$$F[n] = TS[n] + E\mathrm{H}[n] + E\mathrm{xc}[n] \tag{2-33}$$

avec $TS[n]$ l'énergie cinétique du système, $E\mathrm{H}[n]$ l'énergie de Hartree (ou interaction coulombienne électron-noyau) du système et $E\mathrm{xc}[n]$ l'énergie d'échange et corrélation (électron-électron) représentant la tendance naturelle pour deux électrons de spin opposé à s'éviter durant leur déplacement.

### b) Les différentes approximations

La fonctionnelle $E\mathrm{xc}[n]$ n'étant pas connue de façon exacte, nécessite une approximation. Il existe deux approximations différentes :

- La LDA (*Local Density Approximation*) [101] consiste à dire que chaque volume élémentaire du système contribue de la même manière (à l'énergie d'échange-corrélation) qu'un volume élémentaire équivalent de gaz uniforme d'électrons de même densité. On a alors :

$$E_{xc}^{LDA}[n(\vec{r})] = \int \varepsilon\mathrm{xc}\big(n(\vec{r})\big)n(\vec{r})d\vec{r} \tag{2-34}$$

où $\varepsilon\mathrm{xc}\big(n(\vec{r})\big)$ est l'énergie d'échange et corrélation d'une particule dans un gaz uniforme d'électrons de densité n.

Le potentiel ressenti par un électron à l'approche d'un atome (ou d'une surface) n'est pas décrit avec cette approximation, c'est pourquoi une autre approximation a été développée.

- La GGA (*Generalized Gradient Approximation*) [102] permet de considérer un terme d'échange et corrélation prenant en compte également le gradient de la densité en r, *via* $f\mathrm{xc}$ (cette fonction dépend de la densité n(r) et de son gradient).

$$E_{xc}^{GGA}[n(\vec{r})] = \int dr.\, n(\vec{r}) f\mathrm{xc}\big(n(\vec{r})\big), \nabla n(\vec{r}) \tag{2-35}$$

Les équations de Kohn-Sham doivent également être traitées par la méthode du *champ autocohérent* (car le potentiel dépend de la densité électronique qui est calculée avec une fonction d'onde qui elle-même dépend de la densité). Rapidement, la résolution des équations de Kohn-Sham donne accès aux fonctions d'ondes dites de de Kohn-Sham, permettant ainsi de calculer la densité électronique et de remonter à l'énergie totale. Dès lors, deux cas de figures sont possibles : ***(i)*** l'énergie est « convergée », c'est-à-dire que la différence d'énergie entre deux itérations est inférieure à une valeur fixée ; il en résulte que le système a atteint l'énergie fondamentale provoquant l'arrêt de l'algorithme, ***(ii)*** l'énergie n'est pas « convergée », l'algorithme recommence le processus en itérant la densité électronique de départ.

On considère un solide infini en utilisant les propriétés des symétries de translation pour effectuer les calculs. La symétrie de translation est exploitée en utilisant des conditions aux bords périodiques.

### c) Ondes planes et approximation des pseudopotentiels

Les fonctions de bases utilisées généralement lors de tels calculs (solide infini aux conditions aux bords périodiques), sont des ondes planes. La simplicité de ces fonctions et l'utilisation des transformées de Fourier rapides permettent de conserver une bonne efficacité au niveau du temps de calcul, malgré le nombre de fonctions de bases nécessaires pour décrire la structure électronique. Ce choix est combiné à l'approximation des pseudopotentiels. Cette dernière consiste à "découper" un atome en deux parties : d'un côté le noyau et les électrons de cœur, de l'autre les électrons de valence, ces parties étant en interaction entre elles. Il ne reste plus qu'à traiter explicitement la partie des électrons de valence (puisque les électrons de valence sont les seuls à participer aux propriétés chimiques du système).

### d) Déplacement chimique : approche GIPAW (*Gauge Including Projector Augmented Wave*)

Blöchl a montré dans la théorie PAW [103] (*Projector Augmented Wave*) qu'il était possible de reconstruire la réponse « *all-electron* » (électrons de cœur et de valence) à partir de calculs utilisant des pseudopotentiels. Une application de cette méthode est le calcul du tenseur de gradient de champ électrique [104]. Une fois ce dernier obtenu, il est possible de remonter aux paramètres $C_Q$ et $\eta_Q$ des noyaux quadripolaires.

Cette méthode a été utilisée par Pickard et Mauri et a amené à la création de la méthode GIPAW [30]. Le tenseur de déplacement chimique est une réponse des électrons, qui entourent le noyau, au champ magnétique externe. Ceci signifie qu'il dépend fortement de la nature des fonctions d'ondes dans la région de cœur. Il est donc nécessaire de reconstruire la réponse « *all-electron* ».

Le calcul du tenseur de déplacement chimique nécessite de connaitre le courant induit et en particulier son effet au niveau du noyau :

$$\vec{B}\mathrm{in}(\vec{r}) = -[\sigma(\vec{r})]\vec{B}0 \tag{2-36}$$

$$\vec{B}\mathrm{in}(\vec{r}) = \frac{1}{c}\int d^3\, r' j(\vec{r}').\frac{\vec{r}-\vec{r}'}{|\vec{r}-\vec{r}'|^3} \tag{2-37}$$

A partir du courant induit, nous pouvons avoir accès au tenseur d'anisotropie de déplacement chimique (CSA) et donc au déplacement chimique isotrope car :

$$\delta\mathrm{iso} = -[\sigma - \sigma\mathrm{ref}] \tag{2-38}$$

avec $\sigma$ la constante d'écran isotrope (= 1/3 de la trace du tenseur CSA) et $\sigma\mathrm{ref}$ la constante d'écran de référence.

Pour chaque atome on utilise un pseudo potentiel représentant les électrons de cœur qui sont gelés dans la simulation et des ondes planes vérifiant les conditions de Bloch représentant les électrons de

valence. La fonctionnelle utilisée pour les optimisations géométriques est la fonctionnelle GGA : PBE (Perdew-Burke-Ernzerhof) [102].

## Bibliographie Chapitre 2 :


[1] M. H. Levitt, *Spin Dynamics, Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, Second Edition. **2002**.

[2] I. I. Rabi, J. R. Zacharias, S. Millman, and P. Kusch, "A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment," *Phys. Rev.*, 53, 318, **1938**.

[3] C. J. Gorter and L. J. F. Broer, "Negative Result of an Attempt to Observe Nuclear Magnetic Resonance in Solids," *Physica*, 3, 9, 995–998, **1936**.

[4] F. Bloch, "Nuclear Induction," *Phys. Rev.*, 70, 7–8, 460–474, **1946**.

[5] E. Purcell, H. Torrey, and R. Pound, "Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid," *Phys. Rev.*, 69, 1–2, 37–38, **1946**.

[6] A. Abragam, *Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford sci. **1961**.

[7] M. Mehring, *Principles of High Resolution NMR in Solids*, Spinger-Ve. **1983**.

[8] K. Schmidt-Rohr and H. W. Spiess, *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*, Acad. Pres. Elsevier, **1994**.

[9] O. Lafon, "Introduction to NMR of Quadrupolar Nuclei,"power point presentation, **2011**.

[10] K. J. D. Mackenzie and M. E. Smith, *Multinuclear Solid-State NMR of Inorganic Materials*, Pergamon. **2002**.

[11] E. R. Andrew, A. Bradbury, and R. G. Eades, "Removal of Dipolar Broadening of Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Solids by Specimen Rotation," *Nature*, 183, 1802–1803, **1959**.

[12] I. J. Lowe, "Free Induction Decays of Rotating Solids," *Phys. Rev. Lett.*, 2, 7, 285–287, **1959**.

[13] J. Herzfeld and A. E. Berger, "Sideband Intensities in NMR Spectra of Samples Spinning at the Magic Angle," *J. Chem. Phys.*, 73, 12, 6021–6030, **1980**.

[14] R. Schurko, "Introduction to Solid State NMR." [Online]. Available: http://schurko.cs.uwindsor.ca/resources/ssnmr_schurko.pdf.

[15] G. E. Pake, "Nuclear Resonance Absorption in Hydrated Crystals: Fine Structure of the Proton Line," *J. Chem. Phys.*, 16, 4, 327–336, **1948**.

[16] A. Samoson, E. Lippmaa, and A. Pines, "High Resolution Solid-State NMR Averaging of $2^{nd}$-Order Effects by Means of a Double Rotor," *Mol. Phys.*, 65, 4, 1013–1018, **1988**.

[17] A. Llor and J. Virlet, "Towards High-Resolution NMR of More Nuclei in Solids: Sample Spinning with Time-Dependent Spinner Axis Angle," *Chem. Phys. Lett.*, 152, 2–3, 248–253, **1988**.

[18] L. Frydman and J. S. Harwood, "Isotropic Spectra of Half-Integer Quadrupolar Spins from Bidimensional Magic-Angle Spinning NMR," *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 19, 5367–5368, **1995**.

[19] D. Laurencin, A. Wong, R. Dupree, and M. E. Smith, "Natural Abundance $^{43}$Ca Solid-State NMR Characterisation of Hydroxyapatite: Identification of the Two Calcium Sites.," *Magn. Reson. Chem.*, 46, 4, 347–50, **2008**.

[20] R. Dupree, A. P. Howes, and S. C. Kohn, "Natural Abundance Solid State $^{43}$Ca NMR," *Chem. Phys. Lett.*, 276, September, 399–404, **1997**.

[21] A. Wong, A. P. Howes, R. Dupree, and M. E. Smith, "Natural Abundance $^{43}$Ca NMR Study of Calcium-Containing Organic Solids: A Model Study for Ca-binding Biomaterials," *Chem. Phys. Lett.*, 427, 1–3, 201–205, **2006**.

[22] D. Laurencin and M. E. Smith, "Development of $^{43}$Ca Solid State NMR Spectroscopy as a Probe of Local Structure in Inorganic and Molecular Materials," *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 68, 1–40, **2013**.

[23] D. Laurencin, A. Wong, J. V. Hanna, R. Dupree, and M. E. Smith, "A High-Resolution $^{43}$Ca Solid-State NMR Study of the Calcium Sites of Hydroxyapatite," *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 8, 2412–2413, **2008**.

[24] D. Laurencin, C. Gervais, A. Wong, C. Coelho, F. Mauri, D. Massiot, M. E. Smith, and C. Bonhomme, "Implementation of High Resolution $^{43}$Ca Solid State NMR Spectroscopy: Toward the Elucidation of Calcium Sites in Biological Materials," *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 37, 13430–13440, **2009**.

[25] K. M. N. Burgess, F. A. Perras, I. L. Moudrakovski, Y. Xu, and D. L. Bryce, "High Sensitivity and Resolution in $^{43}$Ca Solid-State NMR Experiments," *Can. J. Chem.*, 93, 8, 799–807, **2015**.

[26] D. L. Bryce, "Calcium Binding Environments Probed by $^{43}$Ca NMR Spectroscopy," *Dalton Trans.*, 39, 37, 8593–8602, **2010**.

[27] E. Gambuzzi, A. Pedone, M. C. Menziani, F. Angeli, P. Florian, and T. Charpentier, "Calcium Environment in Silicate and Aluminosilicate Glasses probed by $^{43}$Ca MQMAS NMR Experiments and MD-GIPAW Calculations," *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 68, 31–36, **2015**.

[28] R. Siegel, T. T. Nakashima, and R. E. Wasylishen, "Signal-to-Noise Enhancement of NMR Spectra of Solids Using Multiple-Pulse Spin-Echo Experiments," *Concepts Magn. Reson. Part A Bridg. Educ. Res.*, 26, 2, 62–77, **2005**.

[29] C. Gervais, D. Laurencin, A. Wong, F. Pourpoint, J. Labram, B. Woodward, A. P. Howes, K. J. Pike, R. Dupree, F. Mauri, C. Bonhomme, and M. E. Smith, "New Perspectives on Calcium Environments in Inorganic Materials Containing Calcium-Oxygen Bonds: A Combined Computational-Experimental $^{43}$Ca NMR Approach," *Chem. Phys. Lett.*, 464, 1–3, 42–48, **2008**.

[30] C. J. Pickard and F. Mauri, "All-electron Magnetic Response with Pseudopotentials: NMR Chemical Shifts," *Phys. Rev. B*, 63, 24, 245101, **2001**.

[31] D. L. Bryce, E. B. Bultz, and D. Aebi, "Calcium-43 Chemical Shift Tensors as Probes of Calcium Binding Environments. Insight into the Structure of the Vaterite $CaCO_3$ Polymorph by $^{43}$Ca Solid-State NMR Spectroscopy," *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 29, 9282–9292, **2008**.

[32] H. Colas, L. Bonhomme-Coury, C. C. Diogo, F. Tielens, F. Babonneau, C. Gervais, D. Bazin, D. Laurencin, M. E. Smith, J. V. Hanna, M. Daudon, and C. Bonhomme, "Whewellite, $CaC_2O_4{\cdot}H_2O$: Structural Study by a Combined NMR, Crystallography and Modelling Approach," *CrystEngComm*, 15, 43, 8840, **2013**.

[33] T. Charpentier, "The PAW/GIPAW Approach for Computing NMR Parameters: A New Dimension added to NMR Study of Solids," *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 40, 1, 1–20, **2011**.

[34] J. W. Zwanziger, U. Werner-Zwanziger, J. L. Shaw, and C. So, "Stress, Strain and NMR," *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 29, 1–3, 113–118, **2006**.

[35] M. Jochum, U. Werner-Zwanziger, and J. W. Zwanziger, "Observable Effects of Mechanical

Stress Induced by Sample Spinning in Solid State Nuclear Magnetic Resonance," *J. Chem. Phys.*, 128, 5, **2008**.

[36] A. E. Bennett, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V Lakshmi, and R. G. Griffin, "Heteronuclear Decoupling in Rotating Solids," *J. Chem. Phys.*, 103, 16, 6951–6958, **1995**.

[37] T. Bräuniger, P. Wormald, and P. Hodgkinson, "Improved Proton Decoupling in NMR Spectroscopy of Crystalline Solids Using the SPINAL-64 Sequence," *Curr. Dev. Solid State NMR Spectrosc.*, 69–74, **2003**.

[38] B. M. Fung, A. K. Khitrin, and K. Ermolaev, "An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids," *J. Magn. Reson.*, 142, 1, 97–101, **2000**.

[39] A. Pines, M. G. Gibby, and J. S. Waugh, "Proton-Enhanced Nuclear Induction Spectroscopy $^{13}$C Chemical Shielding Anisotropy in Some Organic Solids," *Chem. Phys. Lett.*, 15, 3, 373–376, **1972**.

[40] A. Pines and T. W. Shattuck, "Enhanced Inhomogeneous Nuclear Spin Echoes for Dilute Spins in Solids," *Chem. Phys. Lett.*, 23, 4, 614–616, **1973**.

[41] J. Schaefer, E. O. Stejskal, and R. Buchdahl, "High-Resolution Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Study of Some Solid, Glassy Polymers," *Macromolecules*, 8, 3, 291–296, **1975**.

[42] S. R. Hartmann and E. L. Hahn, "Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame," *Phys. Rev.*, 128, 5, 2042–2053, **1962**.

[43] C. S. Yannoni, "High-Resolution NMR in Solids: the CP MAS Experiment," *Acc. Chem. Res.*, 15, 7, 201–208, **1982**.

[44] S. Hediger, B. H. Meier, N. D. Kurur, G. Bodenhausen, and R. R. Ernst, "NMR Cross Polarization by Adiabatic Passage through the Hartmann-Hahn Condition (APHH)," *Chem. Phys. Lett.*, 223, 4, 283–288, **1994**.

[45] S. Hediger, B. H. Meier, and R. R. Ernst, "Adiabatic Passage Hartmann-Hahn Cross Polarization in NMR under Magic Angle Sample Spinning," *Chem. Phys. Lett.*, 240, 5–6, 449–456, **1995**.

[46] G. Metz, X. L. Wu, and S. O. Smith, "Ramped-Amplitude Cross Polarization in Magic-Angle-Spinning NMR," *J. Magn. Reson. Ser. A*, 110, 2, 219–227, **1994**.

[47] D. Sakellariou, A. Lesage, P. Hodgkinson, and L. Emsley, "Homonuclear Dipolar Decoupling in Solid-State NMR Using Continuous Phase Modulation," *Chem. Phys. Lett.*, 319, 3–4, 253–260, **2000**.

[48] M. E. Halse and L. Emsley, "Improved Phase-Modulated Homonuclear Dipolar Decoupling for Solid-State NMR Spectroscopy from Symmetry Considerations," *J. Phys. Chem. A*, 117, 25, 5280–5290, **2013**.

[49] R. R. Ernst and W. A. Anderson, "Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance," *Rev. Sci. Instrum.*, 37, 1, 93–102, **1966**.

[50] G. A. Morris and R. Freeman, "Enhancement of Nuclear Magnetic Resonance Signals by Polarization Transfer," *J. Am. Chem. Soc.*, 233, 2, 760–762, **1979**.

[51] D. T. Pegg, D. M. Doddrell, and M. R. Bendall, "Correspondence between INEPT and DEPT Pulse Sequences for Coupled Spin-half Nuclei," *J. Magn. Reson.*, 51, 2, 264–269, **1983**.

[52] S. Cavadini, S. Antonijevic, A. Lupulescu, and G. Bodenhausen, “Indirect Detection of Nitrogen-14 in Solid-State NMR Spectroscopy,” *ChemPhysChem*, 8, 9, 1363–1374, **2007**.

[53] A. B. Barnes, M. L. Mak-Jurkauskas, Y. Matsuki, V. S. Bajaj, P. C. a van der Wel, R. DeRocher, J. Bryant, J. R. Sirigiri, R. J. Temkin, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, and R. G. Griffin, “Cryogenic Sample Exchange NMR Probe for Magic Angle Spinning Dynamic Nuclear Polarization,” *J. Magn. Reson.*, 198, 2, 261–270, **2009**.

[54] D. A. Hall, D. C. Maus, G. J. Gerfen, S. J. Inati, L. R. Becerra, F. W. Dahlquist, and R. G. Griffin, “Polarization-Enhanced NMR Spectroscopy of Biomolecules in Frozen Solution,” *Science*, 276, 5314, 930–932, **1997**.

[55] M. Concistrè, E. Carignani, S. Borsacchi, O. G. Johannessen, B. Mennucci, Y. Yang, M. Geppi, and M. H. Levitt, “Freezing of Molecular Motions Probed by Cryogenic Magic Angle Spinning NMR,” *J. Phys. Chem. Lett.*, 5, 3, 512–516, **2014**.

[56] P. Berthault, G. Huber, and H. Desvaux, “Biosensing using Laser-Polarized Xenon NMR/MRI,” *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 55, 1, 35–60, **2009**.

[57] R. A. Green, R. W. Adams, S. B. Duckett, R. E. Mewis, D. C. Williamson, and G. G. R. Green, “The Theory and Practice of Hyperpolarization in Magnetic Resonance using Parahydrogen,” *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 67, 1–48, **2012**.

[58] C. L. Degen, M. Poggio, H. J. Mamin, and D. Rugar, “Nuclear Spin Relaxation Induced by a Mechanical Resonator,” *Phys. Rev. Lett.*, 100, 13, 1–4, **2008**.

[59] A. W. Overhauser, “Polarization of Nuclei in Metals,” *Phys. Rev.*, 92, 2, 411–415, **1953**.

[60] T. R. Carver and C. P. Slichter, “Experimental Verification of the Overhauser Nuclear Polarization Effect,” *Phys. Rev.*, 102, 4, 975–980, **1956**.

[61] J. Potenza, “Measurement and Applications of Dynamic Nuclear Polarization,” *Adv. Mol. Relax. Process.*, 4, 229–354, **1972**.

[62] K. H. Hausser, D. Stehlik, and J. S. Waugh, *Dynamic Nuclear Polarization in Liquids*, Academic. **1968**.

[63] W. Mueller-Warmuth, K. Meise-Gresch, and J. S. Waugh, *Molecular Motions and Interactions as Studied by Dynamic Nuclear Polarization (DNP) in Free Radical Solutions*, Academic. **1983**.

[64] R. A. Wind, M. J. Duijvestijn, C. van der Lugt, A. Manenschijn, and J. Vriend, “Applications of Dynamic Nuclear Polarization in $^{13}$C NMR in Solids,” *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 17, 33–67, **1985**.

[65] M. Afeworki and J. Schaefer, “Mechanism of Dnp-Enhanced Polarization Transfer Across the Interface of Polycarbonate Polystyrene Heterogeneous Blends,” *Macromolecules*, 25, 16, 4092–4096, **1992**.

[66] L. R. Becerra, G. J. Gerfen, R. J. Temkin, D. J. Singel, and R. G. Griffin, “Dynamic Nuclear Polarization with a Cyclotron Resonance Maser at 5 T,” *Phys. Rev. Lett.*, 71, 21, 3561–3564, **1993**.

[67] R. G. Griffin and T. F. Prisner, “High Field Dynamic Nuclear Polarization—The Renaissance,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12, 22, 5737, **2010**.

[68] M. Rosay, L. Tometich, S. Pawsey, R. Bader, R. Schauwecker, M. Blank, P. M. Borchard, S. R.

Cauffman, K. L. Felch, R. T. Weber, R. J. Temkin, R. G. Griffin, and W. E. Maas, “Solid-state Dynamic Nuclear Polarization at 263 GHz: Spectrometer Design and Experimental Results,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12, 22, 5850, **2010**.

[69] A. Bornet, J. Milani, B. Vuichoud, A. J. Perez Linde, G. Bodenhausen, and S. Jannin, “Microwave Frequency Modulation to Enhance Dissolution Dynamic Nuclear Polarization,” *Chem. Phys. Lett.*, 602, 63–67, **2014**.

[70] C. Sauvée, M. Rosay, G. Casano, F. Aussenac, R. T. Weber, O. Ouari, and P. Tordo, “Highly Efficient, Water-Soluble Polarizing Agents for Dynamic Nuclear Polarization at High Frequency,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 52, 41, 10858–61, **2013**.

[71] A. Zagdoun, A. J. Rossini, D. Gajan, A. Bourdolle, O. Ouari, M. Rosay, W. E. Maas, P. Tordo, M. Lelli, L. Emsley, A. Lesage, and C. Copéret, “Non-aqueous Solvents for DNP Surface Enhanced NMR Spectroscopy,” *Chem. Commun. (Camb).*, 48, 5, 654–6, **2012**.

[72] F. Mentink-Vigier, Ü. Akbey, H. Oschkinat, S. Vega, and A. Feintuch, “Theoretical Aspects of Magic Angle Spinning -Dynamic Nuclear Polarization,” *J. Magn. Reson.*, 258, 102–120, **2015**.

[73] K. R. Thurber and R. Tycko, “Theory for Cross Effect Dynamic Nuclear Polarization under Magic-Angle Spinning in Solid State Nuclear Magnetic Resonance: the Importance of Level Crossings,” *J. Chem. Phys.*, 137, 8, 084508, **2012**.

[74] V. S. Bajaj, M. L. Mak-Jurkauskas, M. Belenky, J. Herzfeld, and R. G. Griffin, “Functional and Shunt States of Bacteriorhodopsin Resolved by 250 GHz Dynamic Nuclear Polarization-Enhanced Solid-State NMR,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 23, 9244–9, **2009**.

[75] M. Rosay, J. C. Lansing, K. C. Haddad, W. W. Bachovchin, J. Herzfeld, R. J. Temkin, and R. G. Griffin, “High-Frequency Dynamic Nuclear Polarization in MAS Spectra of Membrane and Soluble Proteins,” *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 45, 13626–13627, **2003**.

[76] T. Kobayashi, O. Lafon, A. S. Lilly Thankamony, I. I. Slowing, K. Kandel, D. Carnevale, V. Vitzthum, H. Vezin, J.-P. Amoureux, G. Bodenhausen, and M. Pruski, “Analysis of Sensitivity Enhancement by Dynamic Nuclear Polarization in Solid-State NMR: a Case Study of Functionalized Mesoporous Materials,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15, 15, 5553, **2013**.

[77] A. Lesage, M. Lelli, D. Gajan, M. A. Caporini, V. Vitzthum, P. Miéville, J. Alauzun, A. Roussey, C. Thieuleux, A. Mehdi, G. Bodenhausen, C. Copéret, and L. Emsley, “Surface Enhanced NMR Spectroscopy by Dynamic Nuclear Polarization,” *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 44, 15459–15461, **2010**.

[78] T. V. Can, M. A. Caporini, F. Mentink-Vigier, B. Corzilius, J. J. Walish, M. Rosay, W. E. Maas, M. Baldus, S. Vega, T. M. Swager, and R. G. Griffin, “Overhauser Effects in Insulating Solids,” *J. Chem. Phys.*, 141, 6, 10–18, **2014**.

[79] T. Maly, G. T. Debelouchina, V. S. Bajaj, K.-N. Hu, C.-G. Joo, M. L. Mak-Jurkauskas, J. R. Sirigiri, P. C. a van der Wel, J. Herzfeld, R. J. Temkin, and R. G. Griffin, “Dynamic Nuclear Polarization at High Magnetic Fields,” *J. Chem. Phys.*, 128, 5, 052211, **2008**.

[80] A. Abragam and W. G. Proctor, *Une Nouvelle Méthode de Polarisation Dynamique des Noyaux Atomiques dans les Solides*. **1958**.

[81] F. Mentink-Vigier, Ü. Akbey, Y. Hovav, S. Vega, H. Oschkinat, and A. Feintuch, “Fast passage dynamic nuclear polarization on rotating solids,” *J. Magn. Reson.*, 224, 13–21, **2012**.

[82] C. F. Hwang and D. a. Hill, “New Effect in Dynamic Polarization,” *Phys. Rev. Lett.*, 18, 4, 110–112, **1967**.

[83] S. I. Becker, “Guidance of Attention by Feature Relationships: The End of the Road for Feature Map Theories ?,” *Curr. Trends Eye Track. Res.*, 132, 2, 37–49, **2014**.

[84] A. Abragam and M. Goldman, “Principles of Dynamic Nuclear Polarisation,” *Reports Prog. Phys.*, 41, 3, 395–467, **1978**.

[85] M. J. Duijvestijn, C. van der Lugt, J. Smidt, R. a. Wind, K. W. Zilm, and D. C. Staplin, “$^{13}$C NMR Spectroscopy in Diamonds using Dynamic Nuclear Polarization,” *Chem. Phys. Lett.*, 102, 1, 25–28, **1983**.

[86] K. Märker, M. Pingret, J.-M. Mouesca, D. Gasparutto, S. Hediger, and G. De Paëpe, “A New Tool for NMR Crystallography: Complete $^{13}$C/$^{15}$N Assignment of Organic Molecules at Natural Isotopic Abundance Using DNP-Enhanced Solid-State NMR,” *J. Am. Chem. Soc.*, 137, 43, 13796–13799, **2015**.

[87] A. J. Rossini, A. Zagdoun, M. Lelli, A. Lesage, C. Copéret, and L. Emsley, “Dynamic Nuclear Polarization Surface Enhanced NMR Spectroscopy,” *Acc. Chem. Res.*, 46, 9, 1942–51, **2013**.

[88] T. Kobayashi, F. A. Perras, I. I. Slowing, A. D. Sadow, and M. Pruski, “Dynamic Nuclear Polarization Solid-State NMR in Heterogeneous Catalysis Research,” *ACS Catal.*, 5, 12, 7055–7062, **2015**.

[89] T. Gutmann, J. Liu, N. Rothermel, Y. Xu, E. Jaumann, M. Werner, H. Breitzke, S. T. Sigurdsson, and G. Buntkowsky, “Natural Abundance $^{15}$N NMR by Dynamic Nuclear Polarization: Fast Analysis of Binding Sites of a Novel Amine-Carboxyl-Linked Immobilized Dirhodium Catalyst,” *Chem. - A Eur. J.*, 21, 9, 3798–3805, **2015**.

[90] G. Mathies, S. Jain, M. Reese, and R. G. Griffin, “Pulsed Dynamic Nuclear Polarization with Trityl Radicals,” *J. Phys. Chem. Lett.*, 7, 1, 111–116, **2016**.

[91] R. Tycko, “NMR at Low and Ultralow Temperatures,” *Acc. Chem. Res.*, 46, 9, 1923–1932, **2013**.

[92] Q. Z. Ni, E. Daviso, T. V Can, E. Markhasin, S. K. Jawla, T. M. Swager, R. J. Temkin, J. Herzfeld, and R. G. Griffin, “High Frequency Dynamic Nuclear Polarization,” *Acc. Chem. Res.*, 46, 9, 1933–1941, **2013**.

[93] K. R. Thurber and R. Tycko, “Perturbation of Nuclear Spin Polarizations in Solid State NMR of Nitroxide-doped Samples by Magic-Angle Spinning without Microwaves,” *J. Chem. Phys.*, 140, 18, **2014**.

[94] B. Corzilius, L. B. Andreas, A. A. Smith, Q. Z. Ni, and R. G. Griffin, “Paramagnet Induced Signal Quenching in MAS–DNP Experiments in Frozen Homogeneous Solutions,” *J. Magn. Reson.*, 240, 113–123, **2014**.

[95] K.-N. Hu, H. Yu, T. M. Swager, and R. G. Griffin, “Dynamic Nuclear Polarization with Biradicals,” *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 35, 10844–10845, **2004**.

[96] J. Haber, J. H. Block, and B. Delmon, “Manual of Methods and Procedures for Catalyst Characterization (Technical Report),” *Pure Appl. Chem.*, 67, 8–9, 1257–1306, **1995**.

[97] E. Ravera, B. Corzilius, V. K. Michaelis, C. Rosa, R. G. Griffin, C. Luchinat, and I. Bertini,

"Dynamic Nuclear Polarization of Sedimented Solutes," *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 5, 1641–1644, **2013**.

[98] H. Takahashi, D. Lee, L. Dubois, M. Bardet, S. Hediger, and G. De Paepe, "Rapid Natural-Abundance 2D $^{13}C$-$^{13}C$ Correlation Spectroscopy Using Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Solid-State NMR and Matrix-Free Sample Preparation," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51, 47, 1–5, **2012**.

[99] C. Bonhomme, C. Gervais, F. Babonneau, C. Coelho, F. Pourpoint, T. Azaïs, S. E. Ashbrook, J. M. Griffin, J. R. Yates, F. Mauri, and C. J. Pickard, "First-Principles Calculation of NMR Parameters using the Gauge Including Projector Augmented Wave Method: A Chemists Point of View," *Chem. Rev.*, 112, 11, 5733–5779, **2012**.

[100] W. Kohn and L. J. Sham, "Self-Consisten Equations Including Exchange and Correlation Effects," *Phys. Rev.*, 140, 4A, A1133–A1138, **1965**.

[101] D. M. Ceperley and B. J. Alder, "Ground State of the Electron Gas by a Stochastic Model," *Phys. Rev. Lett.*, 45, 7, 566–569, **1980**.

[102] J. P. Perdew, K. Burke, and M. Ernzerhof, "Generalized Gradient Approximation Made Simple," *Phys. Rev. Lett.*, 77, 18, 3865–3868, **1996**.

[103] P. E. Blöchl, "Projector Augmented-Wave Method," *Phys. Rev. B*, 50, 24, 17953–17979, **1994**.

[104] H. Petrilli, P. Blöchl, P. Blaha, and K. Schwarz, "Electric-Field-Gradient Calculations using the Projector Augmented Wave Method," *Phys. Rev. B*, 57, 23, 14690–14697, **1998**.

# Chapitre 3 : RMN et DNP multinucléaire appliquées aux composés synthétiques : oxalates de calcium hydratés et hydroxyapatite

**1. Autour des oxalates de calcium hydratés ..... 110**
a) Caractérisation par RMN des phases d'oxalates de calcium hydratés ..... 110
i. RMN $^{1}$H CRAMPS : une technique de caractérisation rapide … mais complexe ..... 111
ii. RMN $^{13}$C CP MAS : une technique résolue et très informative ..... 113
iii. RMN $^{43}$Ca MAS : un challenge en abondance naturelle ..... 115
b) Effets de la température et de la pression sur les spectres RMN de COM, COD et COT ..... 117
i. Effet de la fréquence de rotation MAS sur les phases COM, COD et COT ..... 120
ii. Découplage des effets de température et de pression ..... 122
iii. Effets de la diminution de température ..... 126

**2. Autour de l'hydroxyapatite (HAp) et des HAp substituées ..... 128**
a) Approche par RMN $^{1}$H, $^{31}$P et $^{13}$C MAS/CP MAS en phase solide ..... 129
b) Noyaux quadripolaires : RMN $^{23}$Na et $^{43}$Ca MAS en phase solide ..... 133

**3. Augmentation de sensibilité par DNP MAS : mise en place des protocoles expérimentaux à partir de CHAp ..... 134**
a) Choix du solvant et du biradical ("DNP juice") ..... 134
b) Expériences 2D DNP CP MAS double et triple résonances ..... 137
c) Expériences 2D $^{13}$C DNP CP MAS double et triple résonances en *abondance naturelle* ..... 145
d) Expériences 2D $^{43}$Ca DNP CP MAS double et en *abondance naturelle* ..... 147

**4. Augmentation de sensibilité par DNP MAS : oxalates de calcium hydratés synthétiques, $CaC_2O_4 \cdot nH_2O$ ..... 160**
a) Recherche d'un couple {solvant/biradical} compatible avec les phases COM, COD et COT ..... 161
b) Interprétation des cartes 2D $^{1}$H → $^{13}$C DNP HETCOR CP MAS : cas du COM ..... 162

**5. Conclusion ..... 164**

# Chapitre 3: RMN et DNP multinucléaire appliquées aux composés synthétiques : oxalates de calcium hydratés et hydroxyapatite

Les phases hydratées de l'oxalate de calcium, dans le contexte général des calcifications pathologiques (calculs rénaux) ont été étudiées de manière systématique par Bak *et coll.* [1]. Il est à noter que l'article est relativement récent (2000) et qu'il s'adressait indéniablement à un public de cliniciens (l'article ayant été publié dans *Journal of Urology*). Dans cette contribution, les auteurs mettent en œuvre des techniques de RMN $^{31}$P et $^{13}$C MAS et CP MAS permettant : ***(i)*** d'identifier certaines phases minérales dans les calculs étudiés comme l'oxalate de calcium, et l'acide urique, ***(ii)*** de différencier des composantes cristallisées et amorphes (en particulier de type phosphates de calcium), ***(iii)*** enfin, d'identifier les espèces protonées et non-protonées dans les échantillons (en adaptant les paramètres de l'expérience de polarisation croisée). Les auteurs utilisent les signatures spectroscopiques d'un certain nombre de références cristallines, de façon à pouvoir donner une interprétation et une quantification raisonnable des spectres obtenus pour les calculs rénaux : phosphates de calcium (tels que la brushite, l'hydroxyapatite, le phosphate tricalcique et la monétite – voir Figure 14 Chapitre 4 partie 2.c).), struvite ($NH_4MgPO_4{\cdot}6H_2O$), phosphate d'ammonium, oxalates de calcium hydratés et acide urique. La Figure 4 de cet article est particulièrement intéressante, dans le sens où elle démontre que les spectres $^{13}$C de l'oxalate de calcium présentent une variabilité évidente en fonction du calcul étudié. Nous reviendrons longuement par la suite sur cette variabilité du massif $^{13}$C correspondant aux atomes de carbones des groupements oxalates, à la fois dans le cas d'échantillons de synthèse et dans le cas de calculs rénaux (Chapitre 4). Les auteurs mettent en avant l'hypothèse selon laquelle les phases whewellite (COM) et weddellite (COD) pourraient être présentes simultanément. Nous verrons qu'il est possible de distinguer nettement ces deux phases par RMN $^{13}$CP MAS.

Duer *et coll.* ont également largement utilisé les techniques avancées de RMN en phase solide (comme l'expérience REDOR [2] pour caractériser les interfaces hybrides organiques-inorganiques dans différentes calcifications pathologiques, telles que des minéralisations de cartilages articulaires, des plaques athérosclérotiques vasculaires et des calculs rénaux. Ainsi, dans une publication récente de 2013, la mise en évidence d'ions citrates dans les différentes calcifications étudiées tend à démontrer leur rôle essentiel dans les processus de biominéralisation [3]. La même équipe de chercheurs a analysé également un grand nombre de calculs rénaux phosphatés par RMN REDOR $^{31}$P–$^{13}$C, mettant en évidence l'implication (complexe) de différentes composantes minérales et organiques telles que : l'hydroxyapatite (carbonatée), la struvite, l'acide urique, les oxalates de calcium hydratés, des molécules de glycosaminoglyanes, des lipides et certaines protéines [4].

L'étude par RMN en phase solide la plus récente concernant la phase synthétique COM (oxalate de calcium monohydraté ou whewellite) a été publiée par Colas *et coll.* [2]. Deux points originaux de ce travail peuvent être mis en avant : ***(i)*** tout d'abord, il a été montré que la RMN $^{43}$Ca MAS pouvait être un outil de caractérisation pertinent, et ce, malgré la très faible sensibilité de ce noyau quadripolaire (I = 7/2 – Chapitre 2 partie 2 c). iii.). Nous reviendrons largement sur ce point dans les sections suivantes. L'analyse par RMN ne se limite donc plus aux noyaux $^{1}$H et $^{13}$C (voire $^{31}$P lorsqu'une phase

apatitique est présente en plus des oxalates de calcium dans les calculs rénaux), ***(ii)*** à notre connaissance, les concepts de la RMN cristallographique [5] combinant données cristallographiques et RMN ont été appliqués ici pour la toute première fois au domaine des oxalates de calcium hydratés. Il a été montré en particulier qu'un "affinement" de type RMN pouvait être atteint, au niveau des polyèdres de coordinations des ions $Ca^{2+}$.

Ce chapitre est consacré à une étude systématique par RMN et DNP multinucléaire en phase solide de l'ensemble des phases synthétiques obtenues durant ce travail de thèse. Les noyaux $^{1}H$, $^{13}C$, $^{31}P$, $^{23}Na$ et $^{43}Ca$ ont été étudiés en tenant compte des spécificités de ceux-ci énoncées dans le Chapitre 2. Nous avons tenté d'optimiser les expériences de RMN/DNP les plus pertinentes de façon à obtenir les signatures spectroscopiques les plus précises. Ce travail préparatoire s'est avéré absolument nécessaire par la suite, lorsque nous avons entrepris l'analyse d'assemblages hybrides complexes tels que les calculs rénaux.

Lors de l'étude des oxalates de calcium hydratés, nous avons conservé à l'esprit la possibilité de mettre en place les protocoles d'analyses les plus simples et rapides possibles, et permettant *in fine* la détermination structurale des objets biologiques (calcifications). Le but recherché ici a été de proposer aux cliniciens de nouvelles approches spectroscopiques (peu ou pas développées actuellement), venant compléter les données obtenues par FTIR, diffusion Raman et analyses sur grands instruments (synchrotron).

La section consacrée à l'hydroxyapatite substituée (par des ions carbonates et $Na^{+}$) est importante pour les deux raisons suivantes : ***(i)*** nous avons démontré pour la première fois un effet DNP majeur dans le cas de nanoparticules d'apatite. Les gains $\varepsilon_{DNP}$ ont pu être estimés à $\sim$ 100 dans certains cas ce qui a permis d'envisager des expériences 2D impliquant le noyau $^{43}Ca$ en *abondance naturelle* ! Nous montrerons que ce résultat est de toute première importance car il ouvre de nouvelles perspectives dans le cadre de l'étude par RMN de noyaux présentant une très faible sensibilité (très faible abondance naturelle et faible valeur de $\gamma$), ***(ii)*** les études préliminaires conduites sur des échantillons d'apatite substituée nous serviront de base solides en vue de l'étude d'échantillons biologiques de petite taille, tels que les plaques de Randall (voir Chapitre 1 partie 2) [6]. Nous rappelons ici que la plaque de Randall correspond à un nucleus d'hydroxyapatite carbonatée de faible taille et de faible masse (< 100 $\mu$g environ). Compte tenu de ces caractéristiques, il est légitime d'anticiper des problèmes importants liés à la faible sensibilité de l'expérience RMN. Ces points seront largement repris dans le Chapitre 4.

## 1. Autour des oxalates de calcium hydratés

### a) Caractérisation par RMN des phases d'oxalates de calcium hydratés

Les spectres présentés dans cette section correspondent aux synthèses du COM, COD et COT décrites dans le Chapitre 1. Chacun des trois hydrates a été analysé par RMN $^{1}H$, $^{13}C$ et $^{43}Ca$. Le noyau $^{17}O$ a été volontairement ignoré, compte tenu de sa très faible sensibilité en abondance naturelle (bas $\gamma$ et abondance naturelle de l'ordre de 0,037 %). L'essentiel des expériences de RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ a été réalisé à l'aide d'un spectromètre 700 MHz ($B_0$ = 16,4 T). Dans le cas du $^{43}Ca$, nous avons évoqué précédemment le fait qu'utiliser un champ magnétique le plus élevé possible était

préférable. Toutes les expériences ont donc été effectuées à l'aide d'un spectromètre 850 MHz ($B_0$ = 20,0 T) à l'Université de Warwick en collaboration avec J. V. Hanna et M. E. Smith.

### *i. RMN $^1$H CRAMPS : une technique de caractérisation rapide … mais complexe*

Les spectres de RMN $^1$H en phase solide sont en général considérablement élargis par l'interaction dipolaire homonucléaire $^1$H–$^1$H. De tels élargissements peuvent être encore perceptibles même à des fréquences MAS très élevées (110 kHz – ultra fast MAS). Il en résulte une diminution significative de la résolution spectrale. Dans le cas des phases COM, COD et COT, les protons des molécules d'eau sont caractérisés par des réseaux de liaisons–H qui contribuent au couplage – *via* l'interaction dipolaire homonucléaire – de l'ensemble des protons de chaque structure considérée. Comme présenté dans le Chapitre 2, il est possible de moyenner l'interaction dipolaire homonucléaire $^1$H–$^1$H par différentes approches, comme la rotation de l'échantillon ultra fast MAS ou la combinaison de la rotation MAS (à fréquence modérée) avec des impulsions RF (expériences DUMBO ou FSLG, *Frequency-Switched Lee–Goldburg* ; PMLG, *Phase-Modulated Lee–Goldburg*) [7]–[10]. On parle alors de méthodes CRAMPS : *Combined Rotation And Multiple Pulses Spectroscopy* [11], [12]. Pour des raisons que nous évoquerons plus tard et reliées à l'évolution en température des phases COM, COD et COT, nous avons opté pour l'expérience DUMBO qui ne nécessite pas une approche de type ultra fast MAS. La Figure 3-1 présente la comparaison entre les spectres MAS et ceux obtenus *via* la séquence DUMBO à la même fréquence MAS de 12 kHz (en pointillés). On remarque un gain en résolution considérable sur la phase COM que nous avons immédiatement exploité pour les deux autres phases COD et COT (voir Figure 3-1). D'un point de vue expérimental, la température de l'échantillon a systématiquement été maintenue à 10°C en utilisant une unité de régulation de température Bruker BCUX. Compte tenu de l'effet d'échelle de la séquence DUMBO sur l'axe des déplacements chimiques $^1$H, il a été nécessaire de calibrer très soigneusement l'échelle des $\delta_{iso}(^1H)$.

Les avantages de l'approche par RMN $^1$H CRAMPS sont ici évidents : ***(i)*** il est tout à fait possible de distinguer les trois phases COM, COD et COT sur la base de leurs spectres $^1$H ainsi résolus. Notons que cela était totalement impossible par simple rotation MAS à fréquence plus élevée, 30 kHz par exemple, ***(ii)*** les spectres $^1$H sont tous obtenus dans des temps très courts de l'ordre de quelques secondes. Il s'agit donc d'une technique de caractérisation très performante, à la fois en terme de pouvoir résolutif que de simplicité et de rapidité. Il est d'ailleurs tout à fait possible d'analyser de manière quantitative des mélanges de phases synthétiques de COM, COD et COT – voire d'utiliser les signatures $^1$H des phases de référence pour analyser qualitativement des échantillons biologiques (voir Chapitre 4), en tenant compte des contributions des composantes organiques (comme des protéines ou des triglycérides).

Les valeurs des $\delta_{iso}(^1H)$ s'étendent d'environ 3 à 7 ppm. Il n'y a là aucune surprise sachant que $\delta_{iso}(^1H)$ est particulièrement sensible aux liaisons O-H···O au sein des réseaux de liaisons–H [13]**.** En revanche, l'interprétation détaillée des spectres $^1$H CRAMPS est complexe. Considérons tout d'abord le spectre $^1$H du COM (Figure 3-1, en rouge). D'après les données cristallographiques [14], deux molécules d'eau inéquivalentes sont présentes dans l'unité asymétrique, ce qui conduit à un total de quatre protons inéquivalents. Un seul pic de résonance est observé, centré sur la valeur $\delta_{iso}(^1H)$ = 5,26 ppm. Nous avons optimisé au mieux la résolution de l'expérience en réglant les paramètres de la séquence DUMBO à l'aide de cette phase COM. Une première hypothèse consiste à

supposer une certaine mobilité des molécules d'eau de la structure (réorientation de 180° par exemple) conduisant à une moyenne des déplacements chimiques. Cela devrait conduire alors à un effet de moyenne identique sur les résonances $^{13}C$ de la structure … ce qui n'est manifestement pas le cas (voir paragraphe ii. ci-dessous). Nous reviendrons sur ce point lors de l'étude de la phase COM par DNP à la température de 100 K (voir paragraphe 4.a).).

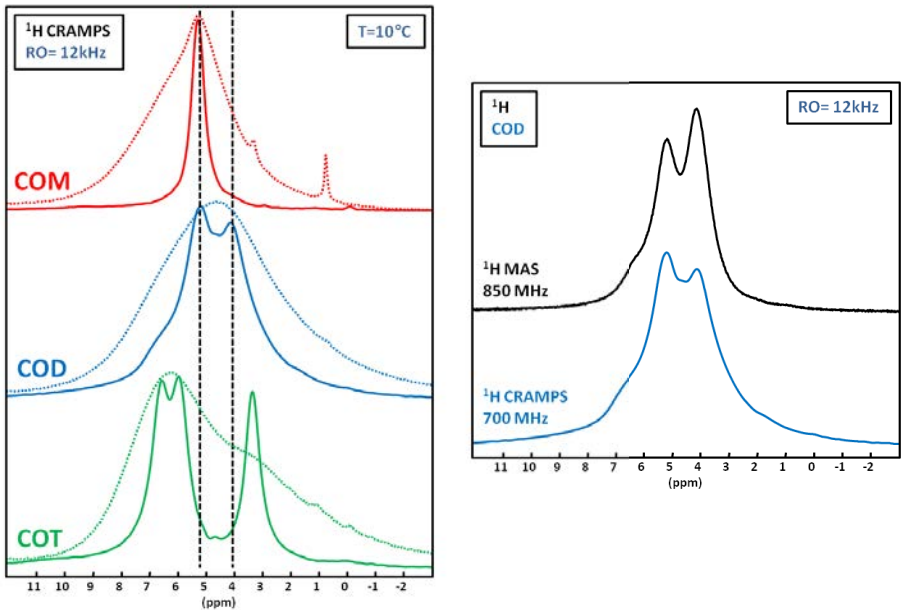



**Figure 3-1 : A gauche : Spectres RMN $^1$H CRAMPS des trois hydrates d'oxalates de calcium, COM, COD et COT obtenus à l'aide de la séquence DUMBO [7]. RO (fréquence de rotation), d1 (délai de relaxation) = 10 s. NS = 20. LB (line broadening) = 10 Hz. Les spectres MAS de chacune des phases sont ajoutés en pointillés à RO équivalente. A droite : comparaison des spectres obtenus sur le COD à 700 MHz (DUMBO) (en bleu) et à 850 MHz (ultra fast MAS 80 kHz) (en noir).**

Le spectre de la phase COD (en bleu sur la Figure 3-1) est difficile à interpréter directement (on observe deux pics assez bien définis situés à $\delta_{iso}(^1H)$ = 4,11 et 5,17 ppm, ainsi qu'un épaulement beaucoup plus large centré sur $\delta_{iso}(^1H) \sim 7$ ppm). Pour s'assurer que la séquence DUMBO n'introduit pas de distorsions spectrales importantes, nous avons décidé d'étudier l'échantillon de COD en rotation ultra fast MAS (ici 80 kHz, sonde JEOL de 1 mm) et à ultra haut champ magnétique ($B_0$ = 20 T). La comparaison des deux spectres du COD démontre que la méthode CRAMPS à 12 kHz et 700 MHz est robuste et n'introduit pas d'artéfact majeur au niveau des spectres. Il est intéressant de rappeler ici que la structure du COD est de nature zéolithique (voir Chapitre 1). La formule ce cette phase dihydratée est en réalité : $CaC_2O_4 \cdot (2+x)H_2O$ avec $x \sim 0,5$. La distribution des molécules d'eau zéolithiques est sans conteste à l'origine d'un certain désordre de positions, qui se traduit par un élargissement des résonances du spectre $^1$H. Nous n'avons pas tenté d'aller plus avant dans l'interprétation des différentes contributions du spectre $^1$H CRAMPS du COD. Des expériences de corrélations $^1$H–$^1$H fondées sur l'interaction dipolaire homonucléaire auraient sans doute pu permettre d'identifier les molécules d'eau participant exclusivement au réseau de liaisons–H. Enfin, le spectre de la phase COT (en vert sur la Figure 3-1) apparaît beaucoup plus résolu que celui du COD et plus informatif que celui du COM. Dans sa structure, on retrouve 3 molécules d'eau soit 6 protons inéquivalents [15]. Trois pics principaux centrés sur $\delta_{iso}(^1H)$ = 3,36, 5,95 et 6,53 ppm sont clairement mis en évidence.

### *ii. RMN $^{13}C$ CP MAS : une technique résolue et très informative*

Les spectres des trois phases COM, COD et COT ont été principalement enregistrés par RMN $^{13}C$ CP MAS. Le choix de la polarisation croisée se justifie ici pleinement car les trois structures présentent des "similitudes" en ce qui concerne les bains de protons et les caractéristiques des noyaux $^{13}C$ : dans tous les cas, nous sommes en présence de noyaux non-protonés ($^{13}COO^-$), pour lesquels la source de polarisation $^1H$ provient de molécules d'eau en liaisons–H. Il en résulte *a priori* des caractéristiques comparables quant aux réglages des trois expériences CP MAS. Notons que l'expérience a été optimisée pour chaque composé et qu'un temps de contact ($\tau_{CP}$) optimal de 10 ms a été choisi par la suite. Pour $\tau_{CP}$ > 10 ms, des effets de $T_{1\rho}(^1H)$ se manifestent pour les champs RF utilisés ici (diminution du signal $^{13}C$).

Le spectre du COM (en rouge sur la Figure 3-2) est caractérisé par 4 pics isotropes centrés sur $\delta_{iso}(^{13}C)$ = 169,13 ; 168,43 ; 168,18 et 167,63 ppm. La largeur de raie moyenne est évaluée à ~ 50 Hz. L'observation de 4 pics isotropes est en accord avec les données cristallographiques de la phase COM (Chapitre 1 partie 1 a).). Nous remarquons immédiatement qu'une résolution importante est ici nécessaire afin de permettre la distinction des différentes résonances $^{13}C$. En effet, toutes les résonances relatives aux ions oxalates sont regroupées dans une très faible gamme de déplacements chimiques isotropes, de 166 à 170 ppm environ. Le réglage de l'angle magique est donc un préalable nécessaire à toute campagne d'expériences, sachant que les noyaux $^{13}C$ des groupements $^{13}COO^-$ sont soumis à une forte anisotropie de déplacement chimique, en particulier à très haut champ magnétique. Le spectre du COD (en bleu sur la Figure 3-2) se distingue nettement des autres. On observe une unique raie de résonance, légèrement déblindée ($\delta_{iso}(^{13}C)$ = 169,72 ppm) et beaucoup plus large (~ 130 Hz). Cette largeur de raie peut être expliquée par une distribution de déplacements chimiques $^{13}C$, consécutive à la présence de molécules d'eau de type zéolithique dans la structure du COD (voir également la discussion relative à la RMN $^1H$ CRAMPS présentée dans le paragraphe i.). Enfin, la phase COT (en vert) est caractérisée par deux résonances fines (~ 40 Hz) centrées sur $\delta_{iso}(^{13}C)$ = 169,42 et 168,44 ppm.

Afin d'être le plus exhaustif possible, les spectres RMN $^{13}C$ MAS ou CP MAS de deux autres dérivés d'oxalates de calcium sont présentés sur la Figure 3-2. Le spectre de la phase anhydre, COAnh (en noir), est bien sûr enregistré à l'aide d'une séquence $^{13}C$ HPDEC (avec découplage du proton durant l'acquisition du signal $^{13}C$) et $\delta_{iso}(^{13}C)$ = 169,05 et 167,25 ppm. Il est à noter que les données cristallographiques indiquent la présence de 4 sites $^{13}C$ inéquivalents dans la structure (Chapitre 1 partie 1 a).). Il se peut tout à fait que les résonances soient très proches deux à deux et qu'elles ne puissent pas être résolues dans les conditions expérimentales choisies. On notera également que la phase de COAnh étudiée ici n'est pas complètement pure, une fraction faible de COM étant mise en évidence par ailleurs par FTIR (de fait, il est assez difficile d'identifier cette composante de COM dans le spectre $^{13}C$ CP MAS, mis à part l'observation de pieds de pics). La phase amorphe d'oxalate de calcium (ACO, en marron sur la Figure 3-2) est caractérisée par un spectre globalement élargi. Alors que la DRX sur poudre de cette phase n'a pas pu être réalisée à cause du peu d'échantillon obtenu, on notera que les effets sur ($\delta_{iso}(^{13}C)$ restent limités à quelques ppm, voire à des fractions de ppm. Nous reviendrons sur ce point particulier par la suite. Ce spectre est en accord avec les observations faites par Hajir *et coll.* [16].

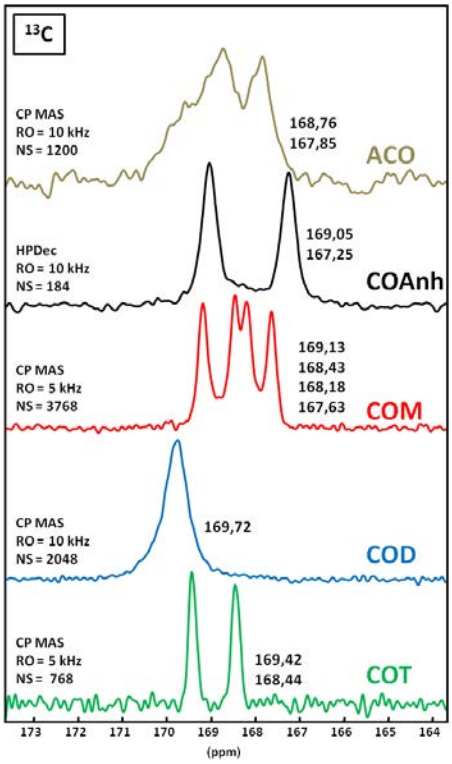



**Figure 3-2 : Spectres RMN $^{13}$C CP MAS des trois phases hydratées d'oxalates de calcium (COM, COD et COT) et de l'oxalate de calcium amorphe (ACO). Le spectre $^{13}$C HPDEC {$^{1}$H} de la phase d'oxalate de calcium anhydre (COAnh) est également présenté. RO : fréquence de rotation MAS (kHz). NS le nombre de scans. d1 (délai de relaxation $^{1}$H) = 3 s. (d1 = 120 s pour COAnh).**

Une première série de conclusions s'impose à ce stade : ***(i)*** comme en RMN $^{1}$H CRAMPS (voir paragraphe i.), la RMN $^{13}$C CP MAS ou HPDEC permet de clairement distinguer l'ensemble des phases d'oxalates de calcium, hydratées ou non, cristallisées ou amorphe. Les temps d'expériences, bien que supérieurs à ceux nécessaires en RMN $^{1}$H CRAMPS, restent tout à fait raisonnables (entre 1 et 2 heures suivant la résolution souhaitée), ***(ii)*** la résolution spectrale est un paramètre essentiel à prendre en compte, sachant que la gamme de déplacements chimiques sondée est très faible, ***(iii)*** les observations en RMN $^{13}$C sont globalement en accord avec les données cristallographiques en terme de sites inéquivalents. Dans le cas du COD, le désordre local généré par la présence de molécules d'eau zéolithiques se manifeste par un élargissement conséquent de la raie de résonance $^{13}$C (un seul pic est d'ailleurs observé et on a bien 1 site inéquivalent présent dans la structure cristallographique), ***(iv)*** enfin, on notera que les élargissements des résonances $^{13}$C restent limités dans le cas de la phase ACO.

L'étude dans la littérature de la phase ACO a été relancée durant ces dernières années [16]–[18]. En effet, les phases amorphes (que ce soient des oxalates de calcium, des phosphates de calcium ou des carbonates de calcium) sont considérées comme des intermédiaires potentiels au cours des processus de biominéralisation [19]–[21]). La description de la synthèse de la phase ACO est très récente [16] : d'après les auteurs, elle a nécessité la mise en œuvre d'un milieu réactionnel non aqueux (éthanol absolu, à température ambiante), de façon à éviter l'obtention directe de la phase COM par un processus de dissolution–recristallisation. Des nanoparticules agglomérées (de diamètre moyen de l'ordre de 10 nm environ) sont alors obtenues sous forme de films minces après ultracentrifugation. Hajir *et coll.* [16] ont ensuite caractérisé cette phase par DRX sur poudre, diffusion Raman, analyses thermiques et RMN $^{13}$C MAS (voir Chapitre 1). Deux pics assez larges,

centrés sur $\delta_{iso}(^{13}C)$ = 167,9 et 168,7 ppm, ainsi qu'un épaulement s'étendant sur la zone 163-172 ppm, sont mis en évidence. Les largeurs de raie sont beaucoup plus importantes que dans le cas du spectre de la phase COM, considéré ici en tant que référence.

De fait, l'apparition d'une phase de type ACO (en parallèle de la formation de cristaux de COM) semble être un phénomène difficile à éviter complètement, y compris dans le cas de synthèse en voie aqueuse.

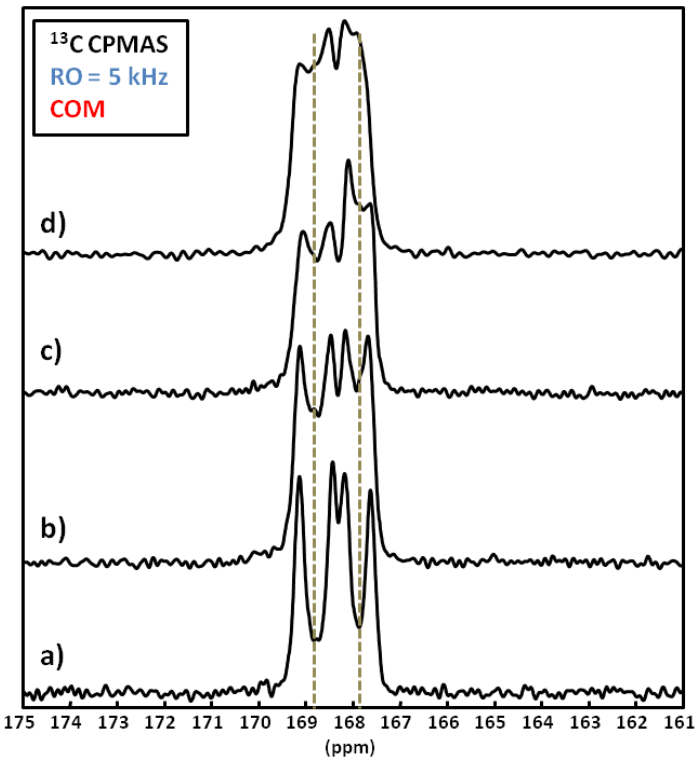



**Figure 3-3 : Spectres $^{13}C$ CPMAS a) échantillon référence de COM Figure 3-2, b) c) et d) échantillons de COM synthétisés par voie aqueuse lors de cette thèse. RO = 5 kHz.**

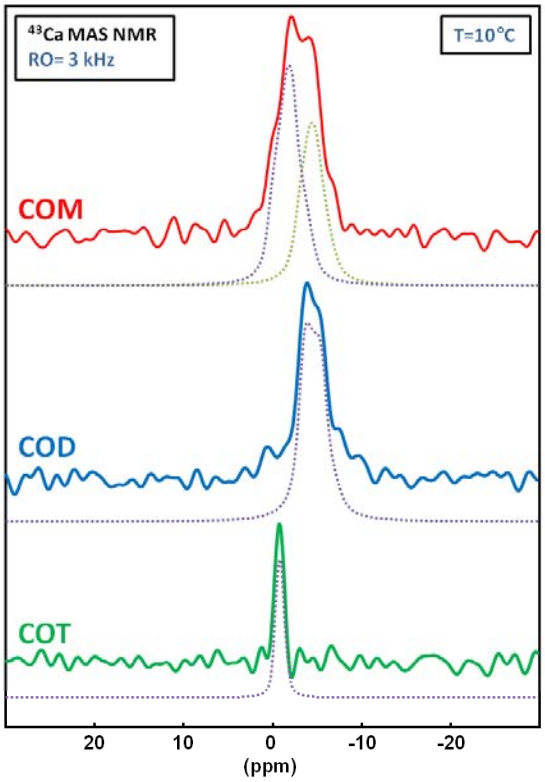
Sur la Figure 3-3, nous présentons une série de spectres $^{13}C$ CP MAS de différents échantillons de COM obtenus par voie aqueuse. Les spectres FTIR, les diffractogrammes de rayons X et les images MEB correspondants indiquent la présence de COM (de manière très majoritaire), la RMN $^{13}C$ CP MAS met en évidence la superposition quasi-systématique de 4 résonances fines (phase COM, dont les $\delta_{iso}(^{13}C)$ peuvent varier très légèrement d'un échantillon à l'autre) à deux composantes plus larges qui peuvent être attribuées à une phase de type ACO (voir paragraphe 1. b). i.)(traits marron Figure 3-3). En d'autres termes, la synthèse en milieu aqueux de mélanges d'ACO/COM semble particulièrement aisée. Nous reparlerons de ce point lors de l'analyse de calculs rénaux formés majoritairement de la phase COM (voir Chapitre 4).

### *iii. RMN $^{43}Ca$ MAS : un challenge en abondance naturelle*

Pour rappel, l'isotope $^{43}Ca$ est un spin quadripolaire (I = 7/2) et présente une très faible abondance naturelle (0,14 %) et un faible rapport gyromagnétique, $\gamma$ (ainsi sur un spectromètre 850 MHz, la fréquence de Larmor du $^{43}Ca$ est de 57,2 MHz). Toutes les expériences ont été effectuées à ultra haut champ magnétique (20 T, 850 MHz), en rotation MAS (5 kHz) et en utilisant des rotors de 7 mm (voir Chapitre 2 partie 2 c). iii.).

A notre connaissance, une unique publication a été reportée dans la littérature, traitant de l'utilisation potentielle de la RMN $^{43}$Ca MAS (en abondance naturelle) dans le cadre des oxalates de calcium et des calculs rénaux [22]. A très haut champ magnétique (900 MHz, 21,1 T), des spectres MAS sont présentés pour les phases COM et COD. Ils sont caractérisés par des rapports signaux/bruit très faibles. De plus, dans le cas de la phase COM, les auteurs attribuent le caractère gaussien de la raie de résonance $^{43}$Ca à un désordre local au niveau de la structure (un tel désordre a été proposé initialement par Tazzoli et Domeneghetti [23])

La Figure 3-4 présente les trois spectres RMN $^{43}$Ca MAS (850 MHz, sonde Bruker de 7 mm, DFS avant l'impulsion RF pour améliorer la sensibilité d'un facteur généralement supérieur à 2 lorsque l'intensité des signaux est prise en compte) des phases COM, COD et COT. Les déplacements chimiques $^{43}$Ca ont été référencés par rapport à une solution aqueuse de $CaCl_2$, 1,0 mol.L$^{-1}$. Ici, le choix d'une solution aqueuse "saturée" de $CaCl_2$ n'est pas judicieux, compte tenu de la variation (aléatoire) du déplacement chimique observé.




| Site | δ (ppm) | $C_Q$ (MHz) | $\eta_Q$ |
|---|---|---|---|
| Ca I | 0,4 | 1,6 | 0,70 |
| Ca II | -2,6 | 1,5 | 0,60 |

| Site | δ (ppm) | $C_Q$ (MHz) | $\eta_Q$ |
|---|---|---|---|
| Ca I | -2,6 | 1,6 | 0,17 |

| Site | δ (ppm) | $C_Q$ (MHz) | $\eta_Q$ |
|---|---|---|---|
| Ca I | -0,05 | 0,94 | 0,60 |

**Figure 3-4 : Spectres RMN $^{43}$Ca MAS des phases synthétiques de COM, COD et COT (spectromètre 850 MHz, sonde 7 mm MAS). DFS avant l'impulsion. Délai de relaxation : 0,8 s. Temps expérimental : COM 1 h 40, COD 4 hrs et COT 1 h 15. Tableaux : paramètres RMN extraits des spectres MAS (à plusieurs champs magnétiques). $\delta_{iso}$($^{43}$Ca) = ± 1,0 ppm, $C_Q$($^{43}$Ca) = ± 0,20 MHz, $\eta_Q$($^{43}$Ca) = ± 0,3 [24].**

Contrairement à la publication de Bowers *et coll.* [22], le spectre $^{43}$Ca MAS du COM présente un bon rapport signal/bruit et n'est pas caractérisé par un signal de type gaussien. A l'aide d'expériences à deux champs magnétiques, Colas *et coll.* [24] ont démontré que le spectre pouvait être simulé à l'aide de deux sites, dont les paramètres sont précisés sur la Figure 3-4. La présence de deux sites distincts est compatible avec les données cristallographiques de la phase COM (Ca1 et Ca2 - voir Chapitre 1). Les spectres RMN $^{43}$Ca MAS des phases COD et COT sont présentés également sur la Figure 3-4. On notera des différences explicites tant au niveau des déplacements chimiques

isotropes que des paramètres quadripolaires. Les deux spectres relatifs au COD et au COT ont été simulés avec un seul site, en accord avec les structures cristallographiques publiées (Ca1). Dans le cas du COT, la constante quadripolaire est particulièrement difficile à évaluer, sachant que les éventuelles bandes de rotation des transitions satellites ne sont pas nettement détectables.

En conclusion, et contrairement aux données de la littérature, il est assez aisé d'enregistrer des spectres $^{43}$Ca MAS pour les différentes phases d'oxalates de calcium hydratés. Il s'agit là d'une nouvelle approche spectroscopique qui sera étendue à l'étude de calcifications pathologiques (voir Chapitre 4). Notons d'ores et déjà que Bowers *et coll*. [22] ont également publié un spectre de $^{43}$Ca MAS dans le cas d'un calcul rénal. En comparaison des spectres $^{43}$Ca MAS des phases COM, COD et COT, un décalage global des déplacements chimiques (shielding de plusieurs ppm) est observé et attribué aux interactions potentielles entre les cristaux présents dans le calcul et les composantes organiques. Cette hypothèse sera rediscutée au cours du Chapitre 4 lorsque nous présenterons les spectres $^{43}$Ca MAS de plusieurs calcifications.

### b) Effets de la température et de la pression sur les spectres RMN de COM, COD et COT

L'historique de cette section (qui démarre de fait au tout début de notre travail de thèse !) est à relier à notre volonté initiale d'enregistrer des spectres $^{13}$C CP MAS des phases COM, COD, COT (et des calculs rénaux) en utilisant des fréquences de rotation MAS les plus élevées possibles, dans le but de moyenner au mieux les effets de CSA et de couplages dipolaires. Au-delà de 10 kHz, il est apparu que des modifications profondes des spectres étaient observées, certaines étant réversibles, d'autres ne l'étant manifestement pas … Bien entendu, nous avons mis en cause l'élévation de température au sein de l'échantillon due à la friction du gaz de rotation sur le rotor contenant l'échantillon. Il s'agit d'un phénomène bien connu des constructeurs (comme Bruker) qui fournissent des abaques, telles que celle présentée ci-dessous pour chaque diamètre de sonde et pour une fréquence de rotation MAS donnée.

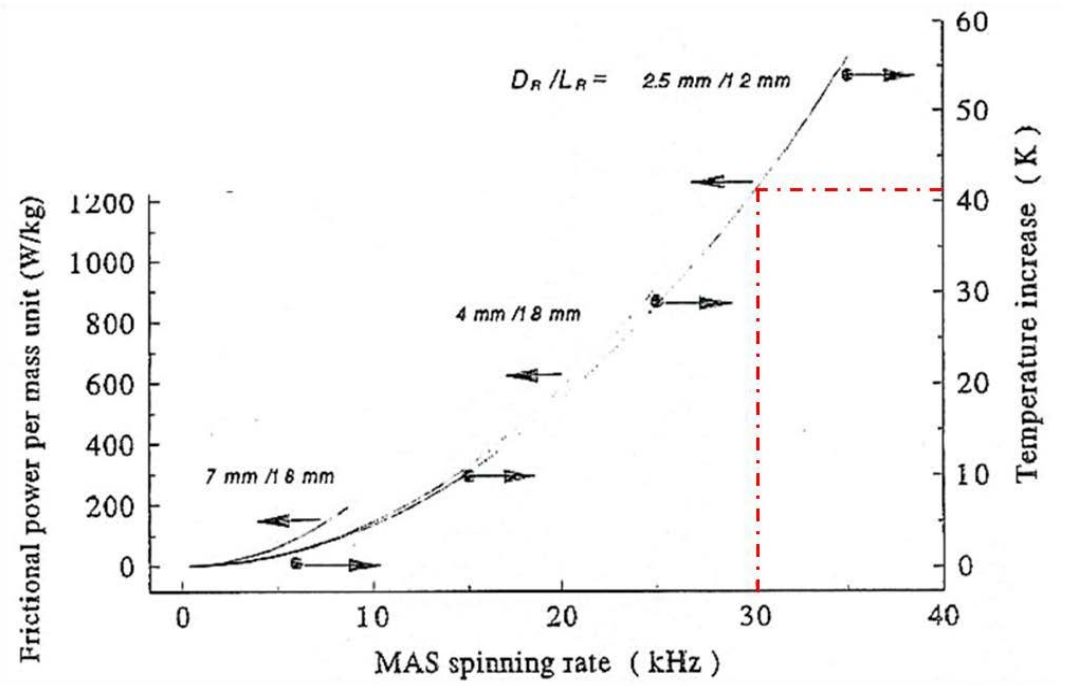



**Figure 3-5 : Courbes représentant l'élévation de température de l'échantillon (en K) à l'intérieur du rotor et en rotation MAS pour un type de sonde donnée : 7, 4, et 2,5 mm (catalogue BRUKER).**

On note qu'en absence de toute régulation de la température (par exemple *via* l'unité Bruker BCUX), et pour une sonde de 2,5 mm de diamètre, l'élévation de température de l'échantillon est de l'ordre de 41 K à la fréquence MAS de 30 kHz. Dans la partie suivante, le terme « T° OFF » désigne les expériences réalisées sans régulation de la température et donc soumises à son élévation lors de la rotation à l'angle magique.

Considérant la structure des oxalates de calcium (présence de molécules d'eau), il n'est donc pas étonnant d'observer des modifications au niveau de spectres $^{13}C$ CP MAS. Nous rappelons ici que le COM correspond à la phase thermodynamiquement stable, alors que les phases COD et COT sont métastables et ont tendance à se déshydrater spontanément (voir Chapitre 1). Depuis des décennies, des expérimentateurs ont mis au point des méthodes ingénieuses pour mesurer la température (ainsi que les gradients de température), à l'intérieur de l'échantillon, *in situ*. Citons par exemple : ***(i)*** les travaux de Bielecki et Guan [25], [26], utilisant la variation du déplacement chimique du $^{207}Pb$ dans le nitrate de plomb ou ceux de Grimmer *et coll.* utilisant le déplacement chimique du $^{119}Sn$ dans l'oxyde $Sm_2Sn_2O_7$ [27], ***(ii)*** les travaux plus récents de Thurber *et coll.* [28]qui utilisent les propriétés particulières (déplacement chimique isotrope et temps de relaxation $T_1$) du noyau $^{79}Br$ dans KBr. Les auteurs relient directement ces paramètres à la température de l'échantillon (*in situ*) et observent la variation suivante : $-0{,}0250$ ppm.$K^{-1}$. En d'autres termes, une élévation de température de 41 K (voir ci-dessus) va se traduire par un décalage de $-1{,}025$ ppm de la raie de résonance du $^{79}Br$ … ce qui est tout à fait mesurable expérimentalement.

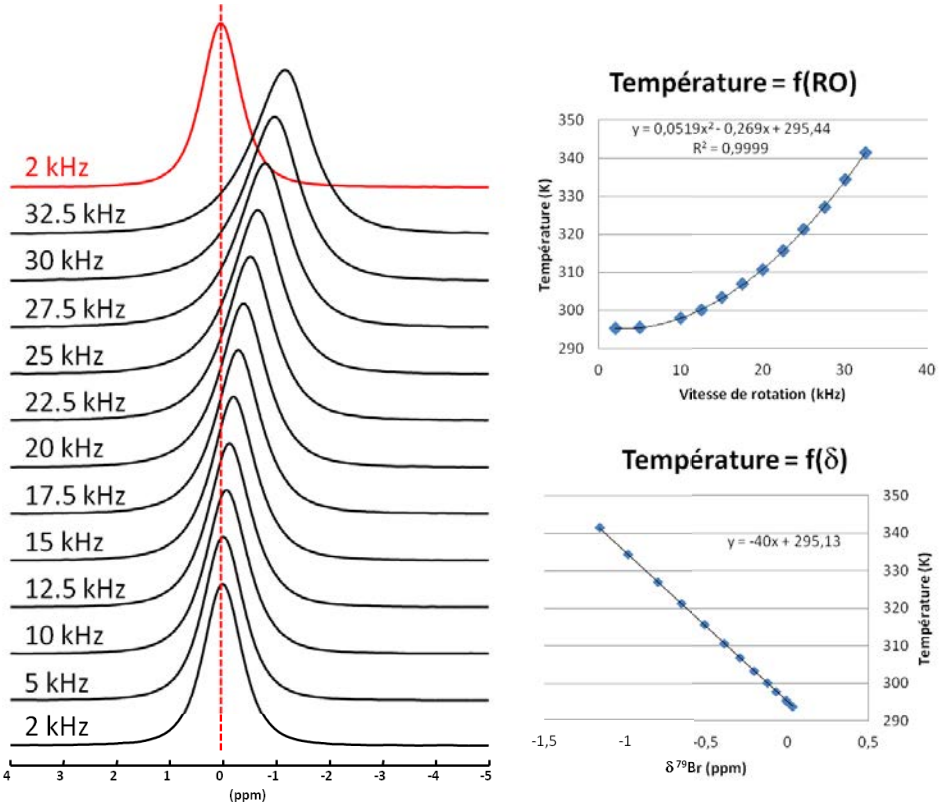



**Figure 3-6 : Spectres $^{79}$Br de KBr (rotor plein) en fonction de la fréquence de rotation MAS (de 2 à 32,5 kHz) dans le cas d'une sonde Bruker 2,5 mm. Les courbes à droites montrent l'évolution de la température en fonction de la vitesse de rotation et en fonction de $\delta^{79}$Br (d'après l'équation de Thurber et *coll.* [28] appliquée aux $\delta^{79}$Br expérimentaux).**

La variation du déplacement chimique isotrope $^{79}$Br de KBr dans un rotor de 2,5 mm (rotor plein) en fonction de la fréquence de rotation MAS est présentée sur la Figure 3-6. Dans ce cas, aucune régulation en température n'est mise en place. Pour une fréquence de 2 kHz, un pic symétrique (~ 130 Hz) est observé et calé arbitrairement à 0,00 ppm en déplacement chimique. A chaque palier en fréquence, un délai de 10 minutes est respecté avant toute expérience RMN afin de permettre à l'ensemble de l'échantillon de s'équilibrer thermiquement (cette durée a été optimisée). On remarque que pour une fréquence MAS inférieure à 10 kHz, l'échauffement de l'échantillon est négligeable (en accord avec les données du constructeur – voir Figure 3-5 ci-dessus). A haute fréquence (supérieure à 12,5 kHz), on observe à la fois un décalage (shielding) de la raie de résonance (en accord avec les travaux de Thurber *et coll.*), ainsi qu'une asymétrie de la résonance (celle-ci est notable à 32,5 kHz, la largeur de raie est de l'ordre de 230 Hz). Nous attribuons cette asymétrie à la présence de gradients de température à l'intérieur du rotor. De tels gradients sont également facilement mis en évidence par RMN $^{207}$Pb MAS du nitrate de plomb (données non reportées ici). Lorsque la fréquence de rotation est ramenée à 2 kHz, on observe un pic symétrique centré à 0,00 ppm (spectre en rouge sur la Figure 3-6), superposable au spectre obtenu en début d'expérience.

Afin d'étudier les effets de la rotation MAS sur les phases synthétiques de COM, COD et COT, nous avons mélangé les poudres obtenues avec du KBr de façon à obtenir une mesure *in situ* de la température. L'idée n'a pas été couronnée de succès compte tenu du caractère hygroscopique du bromure de potassium. En mélange avec un oxalate de calcium di- ou trihydraté, KBr réagit avec celui-ci et conduit à une accélération de la déshydratation. Ce phénomène est bien représenté sur la

Figure 3-7. Le spectre RMN $^{79}$Br MAS en rouge correspond à un échantillon de COD synthétique en mélange avec KBr, à une fréquence MAS de 5 kHz. A une telle fréquence, l'élévation de température est négligeable (voir ci-dessus). Néanmoins, au cours du temps (16 heures), le spectre $^{79}$Br subit des modifications très importantes : le pic centré à 0,0 ppm s'élargit (spectre en bleu) et une nouvelle composante large apparaît à environ – 33 ppm. Cette composante large est attribuée sans ambiguïté à des noyaux $^{79}$Br en forte interaction avec des molécules d'eau. En effet, l'ajout d'une goutte d'eau à l'intérieur d'un rotor rempli de KBr conduit à l'observation d'une telle résonance. En d'autres termes, la structure COD s'est déshydratée spontanément au contact de KBr (pour donner une phase de type COM, comme nous le verrons par la suite). En conséquence, nous avons décidé, pour la suite des expériences en rotation MAS à fréquence variable, d'"isoler" le KBr de l'échantillon d'oxalate de calcium hydraté considéré. KBr a été placé au fond du rotor mais toujours en contact du reste de la poudre. La température mesurée *via* la résonance $^{79}$Br de KBr correspond donc à la partie basse du rotor dans toutes les expériences à venir.

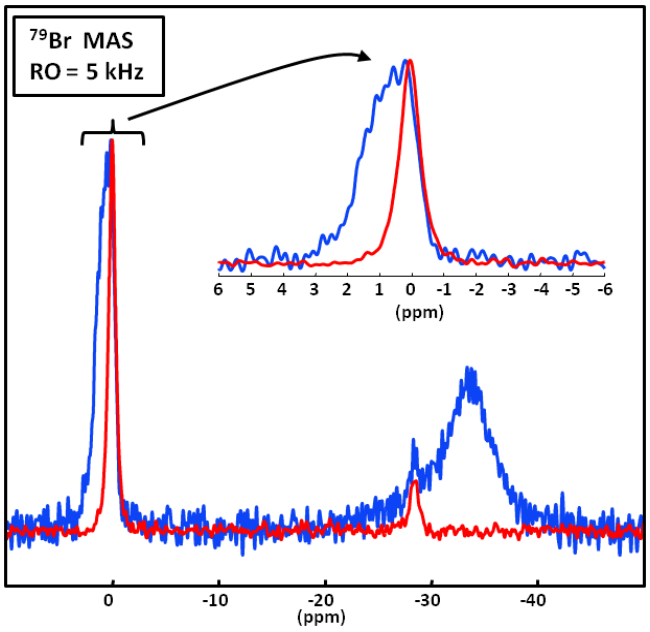



**Figure 3-7 : Spectres $^{79}$Br (en rouge) d'un mélange KBr + COD (rotor plein) pour une fréquence MAS de 5 kHz. Après une période d'environ 16 heures, le spectre $^{79}$Br se modifie notablement due à l'hydratation partielle de KBr et la transformation spontanée de COD en COM (en bleu).**

### *i. Effet de la fréquence de rotation MAS sur les phases COM, COD et COT*

Dans un premier temps, nous avons évalué les modifications des spectres $^{13}$C CP MAS de manière systématique pour les trois phases de COM, COD et COT. Sur la Figure 3-8 sont présentés les résultats obtenus en fonction de la fréquence de rotation MAS. Une montée progressive de la fréquence est effectuée jusqu'à 30 kHz, suivie d'une redescente de celle-ci jusqu'à 5 kHz. Une période de 10 minutes (avant toute impulsion RF) permet à l'ensemble de l'échantillon de s'équilibrer en température. A la fréquence de 5 kHz, nous estimons que l'élévation de température à l'intérieur du rotor de 2,5 mm est négligeable. La mesure de la température est effectuée *in situ* à l'aide de KBr (voir ci-dessus).

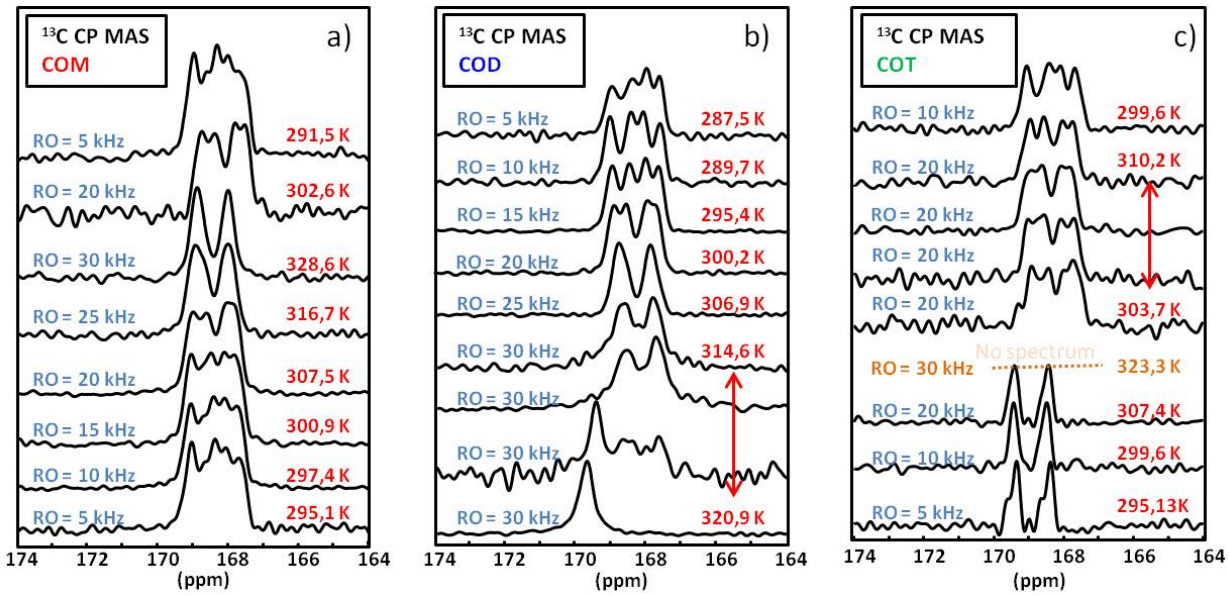



**Figure 3-8 : Effets de l'augmentation de la fréquence de rotation MAS (de 5 kHz, spectre du bas, à 30 kHz puis retour à 5 kHz, spectre du haut. Sonde MAS de 2,5 mm. Aucune régulation en température n'est mise en œuvre. a) COM. b) COD (ici, le premier spectre à 30 kHz (en bas) correspond au point de départ de l'évolution du composé. c) COT.**

Sur la Figure 3-8c, le spectre caractéristique du COT (2 pics isotropes) est observé à 5 kHz. La montée en fréquence (à 30 kHz) ne produit pas de modifications notables tout au moins sur une période limitée de temps. Après plusieurs heures, on observe une transformation progressive conduisant *in fine* à un spectre présentant 4 pics isotropes. Un tel spectre est compatible avec l'obtention de la phase COM. L'évolution de la phase COD (Figure 3-8b, 1 unique pic élargi par rapport au COT – voir Figure 3-2) est, elle-aussi, initiée après une certaine période de temps, en rotation à 30 kHz. A cette vitesse, on remarque une différence de température due à la réaction *in situ* (réaction endothermique – voir Chapitre 1). Au cours de la descente en fréquence de rotation MAS, on remarque une fois encore l'apparition d'une phase de type COM. En d'autres termes, les deux phases COD et COT, métastables, se transforment *in situ* en la phase thermodynamiquement stable, à savoir le COM, (par déshydratation partielle). Les résultats concernant la phase de COM sont présentés sur la Figure 3-8a. De manière particulièrement intéressante, la phase COM subit également des transformations notables, mais réversibles (contrairement aux phases COD et COT).

A ce stade de cette étude, nous pouvons tirer les conclusions suivantes : ***(i)*** les trois phases COM, COD et COT subissent des transformations *in situ* lors du cycle montée/descente de la fréquence de rotation MAS, ***(ii)*** les phases COD et COT évoluent systématiquement vers la phase thermodynamiquement stable, COM. L'évolution du COD est progressive alors que la transformation de COT est plus abrupte. On remarque de plus que la phase anhydre COAnh (voir Figure 3-2) n'est jamais obtenue, ***(iii)*** la phase COM est également sensible aux effets de la rotation MAS, mais de façon réversible, ***(iv)*** dans les cas du COM et du COD, on observe un passage par un spectre très caractéristique, comportant 2 pics assez larges et centrés sur $\delta_{iso}(^{13}C)$ = 167,9 et 168,8 ppm (l'observation est beaucoup moins nette dans le cas du COT). Il est très curieux de constater que ces déplacements chimiques correspondent à ceux de la phase ACO (voir Figure 3-9).

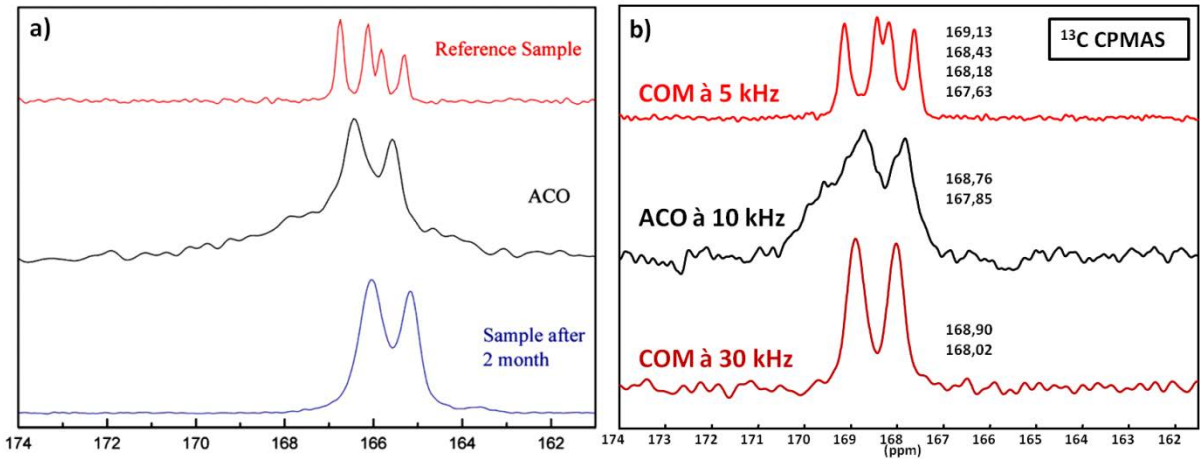



**Figure 3-9 : Spectres $^{13}$C CP MAS a) spectre de COM en rouge et ACO en noir et bleu d'après [16] b) en haut spectre de COM à RO = 5 kHz, au milieu spectre ACO à 10 kHz et en bas spectre de COM à 30 kHz.**

Nous mentionnons également qu'une publication étudie une transformation de phase pour le COM entre 318 et 425 K [29]. Le groupe d'espace observé est alors I2/m (au lieu de $P2_1/c$). Dans ce cas, le nombre de sites $^{13}$C inéquivalents est de 2, ***(v)*** on remarque que les spectres $^{13}$C CP MAS des différents échantillons de COM obtenus ne sont pas strictement identiques. Cette observation est en accord avec les remarques faites dans le paragraphe 1. a). ii., ci-dessus (Figure 3-3).

Sachant que l'augmentation de la fréquence MAS induit des effets simultanés de *température* et de *pression*, nous avons tenté de les "découpler" en mettant en place les expériences suivantes :

- tout d'abord, en choisissant une fréquence de rotation modérée (afin de ne pas induire d'élévation locale de température) et en faisant varier progressivement la température grâce à un module de régulation (BCUX). Dans ce cas, les effets de pression sont maintenus constants et seuls les effets de T sont étudiés.
- Ensuite, en régulant la température à une valeur fixée, et en augmentant progressivement la fréquence de rotation, de façon à mesurer les effets éventuels de pression.

### *ii. Découplage des effets de température et de pression*

Lors des expériences en rotation à l'angle magique, il est admis qu'une élévation de température au sein de l'échantillon survient, due aux phénomènes de friction. De tels phénomènes ont été bien décrits en particulier par Grimmer et *coll.*[27], [30]. Des composés (magnétiquement actifs) ont été sélectionnés de manière à donner une indication précise de la température à l'intérieur du rotor (le déplacement chimique isotrope est dépendant de T et donc de la fréquence de rotation MAS. Le plus utilisé d'entre eux est certainement le nitrate de plomb, $Pb(NO_3)_2$ ($^{207}$Pb : I = ½).

Curieusement, les effets de pression (ou stress, ou force appliquée par unité de surface) sont peu mis en avant alors qu'à 30 kHz (sonde MAS de 2,5 mm), des forces centrifuges considérables s'appliquent à l'échantillon. Jochum *et coll.* [31] ont ainsi calculé qu'à 30 kHz, un échantillon standard en terme de densité et de coefficient de Poisson pouvait subir des pressions de l'ordre de 25 MPa (250 bars). De manière assez contre-intuitive, le stress est maximum au centre du rotor (et non sur les bords). Cela se traduit expérimentalement par la formation d'un cône vide au centre de l'échantillon que l'on observe après l'expérience MAS.

Zwanziger *et coll.* [32] ont démontré à l'aide de monocristaux de $Pb(NO_3)_2$ et de GaP (en mode statique) qu'une pression appliquée (même faible, de l'ordre de 1 MPa (10 bars)) pouvait induire des effets notables et mesurables sur le déplacement chimique et les paramètres quadripolaires. Ces effets ont été également observés sur des monocristaux de GaP en rotation MAS rapide [31]. Dans le cas d'un échantillon de poudre de GaP, l'effet sur $\delta_{iso}(^{31}P)$ est beaucoup plus faible mais reste néanmoins mesurable (la valeur du shift de $\delta_{iso}(^{31}P)$ vaut alors ~ 1/3 de la valeur observée à partir du monocristal de GaP). Dans tous les cas étudiés, les auteurs ont utilisés $Pb(NO_3)_2$ comme thermomètre interne, de façon à distinguer clairement les effets de shift dus à la température, de ceux dus à la pression.

Dans la suite de cette section, nous utiliserons KBr ($^{79}Br$) comme thermomètre interne de façon à fixer la température de l'échantillon ou de la faire varier à dessein.

A droite de la Figure 3-10, un spectre caractéristique du COD est observé à 10 kHz et à température non régulée (T° OFF). Aucune modification du spectre n'est observée : ***(i)*** à température régulée (297 K) et à haute fréquence MAS (30 kHz) sur 6 heures, ***(ii)*** à température régulée (313 K) et à fréquence MAS modérée (10 kHz) sur 12 heures. En revanche, lorsque température *et* fréquence de rotation MAS augmentent de concert (partie gauche de la Figure 3-10), alors la transformation rapide du COD en ACO (ou COM - voir Figure 3-8) est bien mise en évidence. Nous concluons que les effets combinés de la température et de la pression reliés à l'augmentation de la fréquence de rotation MAS sont à l'origine de la transformation *in situ* de la phase COD en COM.

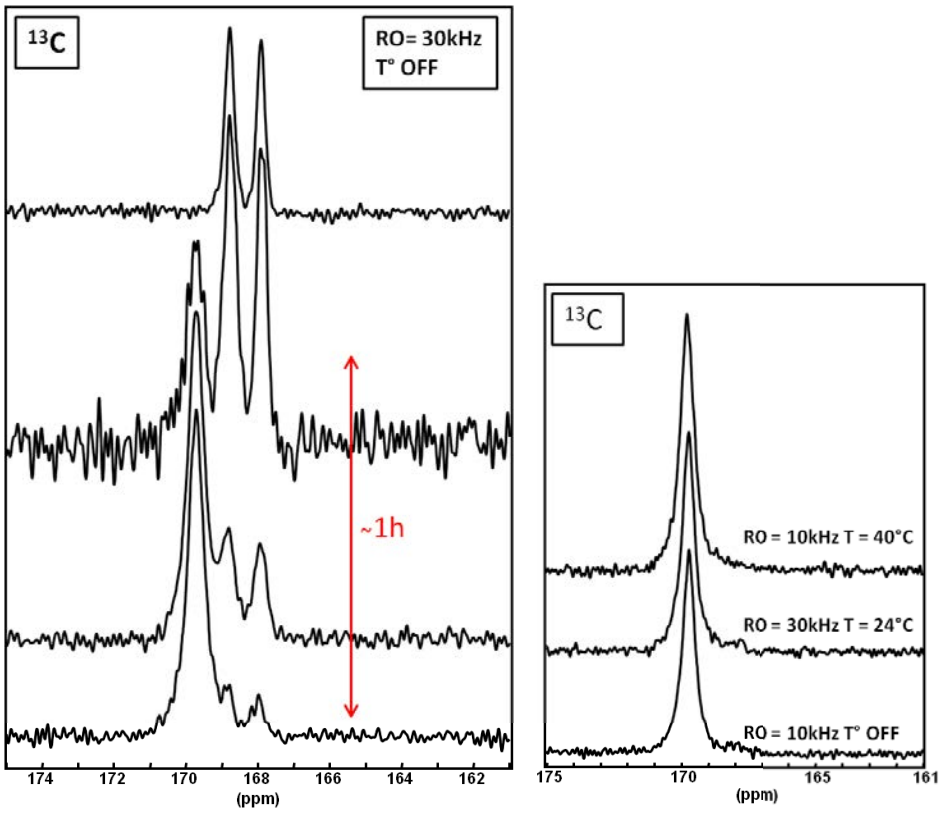



**Figure 3-10 : Spectres $^{13}C$ CP MAS de la phase COD et évolution en fonction de la température de l'échantillon et de la fréquence de rotation MAS. T° OFF : pas de régulation de la température à l'aide du module BCUX. A gauche : fréquence de rotation MAS : 30 kHz et pas de régulation de la température. A droite : différentes fréquences de rotation MAS avec régulation active de la température de l'échantillon. d1 = 2 s et NS = 2048. Le spectre en haut à gauche est obtenu après ré-optimisation des paramètres de polarisation croisée avec NS = 256.**

L'approche expérimentale a été similaire pour l'étude des transformations *in situ* du COT. Sur la partie droite de la Figure 3-11 la température a été régulée à 298 K et la fréquence de rotation est élevée : 30 kHz. Aucune modification n'est observée sur 1 heure (par manque d'échantillon cette expérience n'a pas pu être réalisée sur un temps plus long). En revanche, une élévation de température (313 K) à fréquence MAS modérée (10 kHz) conduit à une lente évolution de la phase COT en COM (partie gauche de la Figure 3-11). Une différence fondamentale distingue l'évolution du COT de celle du COD (voir Figure 3-8) : en effet, dans le cas du COT, le passage par la phase ACO n'est pas du tout observée. En d'autres termes, la déshydratation (de trois à une molécule d'eau par entité $CaC_2O_4$) est progressive, avec un abaissement de la symétrie local. On remarque que le pic situé à 168,44 ppm est commun à COT et COM**.** Dans le cas du COD (voir Figure 3-10), l'effet combiné de la pression et de la température agit très certainement sur la structure zéolithique, conduisant à une phase peu définie (de type ACO).

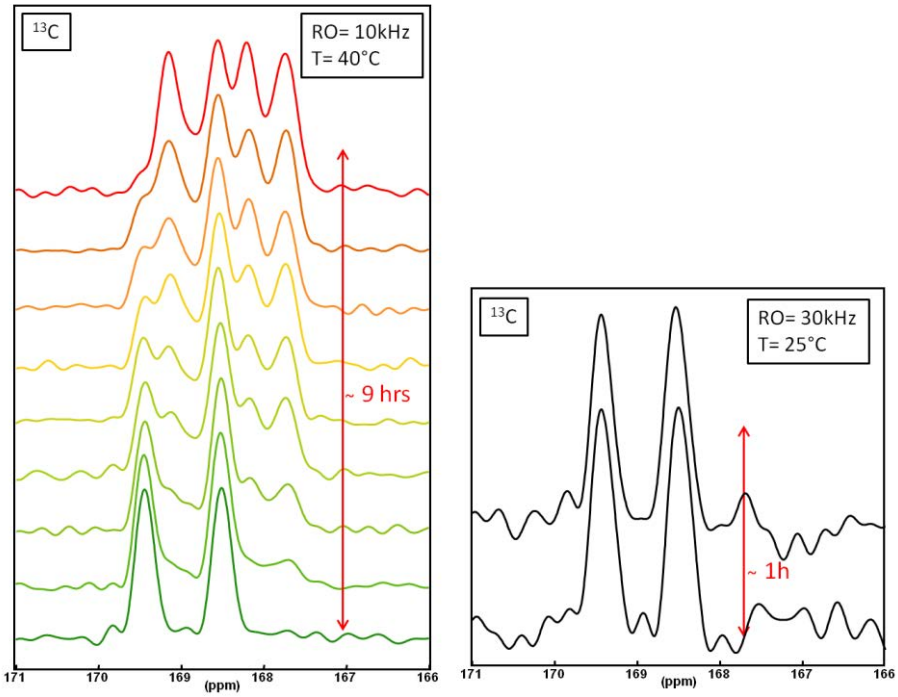



**Figure 3-11 : Spectres $^{13}C$ CP MAS de la phase COT et évolution en fonction de la température de l'échantillon et de la fréquence de rotation MAS. A droite : fréquence de rotation MAS : 30 kHz et température régulée à 25°C. A gauche : fréquence de rotation MAS : 10 kHz et température régulée à 40°C. d1 = 2 s et NS = 512.**

D'un point de vue plus en lien avec les observations cliniques, ce résultat est particulièrement intéressant. En effet, il est démontré qu'à environ 40°C (soit une température proche de celle du corps humain), la phase COT se déshydrate partiellement, mais assez rapidement, en COM. Or, il est un fait acquis que la phase trihydratée d'oxalate de calcium (COT) n'est pas observée au niveau des calculs rénaux. Quant à la phase zéolithique de type COD, nous avons vu précédemment que l'effet de la seule température n'était pas suffisant pour induire la transformation en COM. De fait, les cristaux de COD (en forme de bipyramides caractéristiques) sont observés dans les calcifications rénales (voir Chapitre 1).

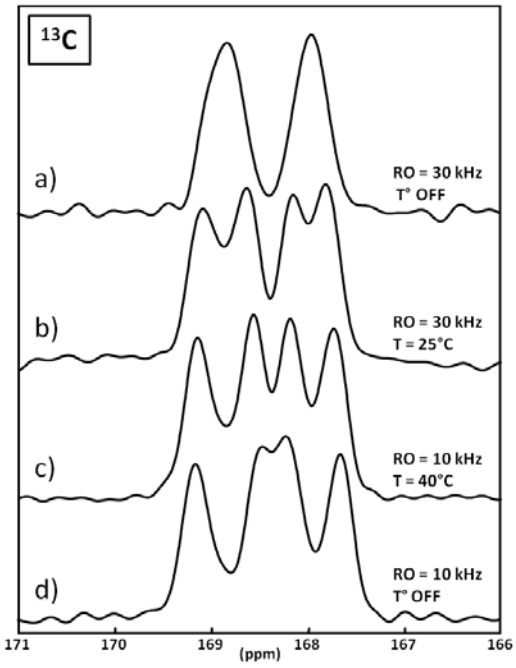



**Figure 3-12 : Spectres $^{13}$C CP MAS de la phase COM et évolution en fonction de la température de l'échantillon et de la fréquence de rotation MAS. T° OFF : pas de régulation active de la température. d1 = 2 s et NS = 256 (512 pour le spectre c)).**

Enfin, l'évolution du spectre $^{13}$C CP MAS du COM est présentée sur le Figure 3-12. De légères variations (essentiellement au niveau des déplacements chimiques isotropes – ~ 0,1 ppm) sont observées dans le cas d'une fréquence de rotation MAS modérée (température régulée). Les modifications sont beaucoup plus importantes lorsque pression *et* température agissent simultanément. En conclusion, la phase COM est peu sensible aux seuls effets de température, bien que la RMN $^{13}$C CP MAS soit suffisamment résolutive pour mettre en évidence de très faibles variations de structure.

Nous terminons cette section en montrant que l'effet de la rotation MAS peut également influencer le déplacement chimique isotrope de noyaux quadripolaires comme le $^{23}$Na (I = 3/2). Dans le Chapitre 5, nous avons décrit la synthèse de gros cristaux (taille de l'ordre de plusieurs mm) de l'hydrogénooxalate de sodium monohydraté, $NaHC_2O_4{\cdot}H_2O$. Les déplacements chimiques $^1$H et $^{13}$C de ce composé sont les suivants : $\delta_{iso}(^1H)$ = 4,9 ($\underline{H}_2O$) et 15,6 ppm (COO$\underline{H}$) ; $\delta_{iso}(^{13}C)$ = 164,9 ($\underline{C}OOH$) et 166,1 ppm ($\underline{C}OO^-$).

Du point de vue de la cristallographie, $NaHC_2O_4{\cdot}H_2O$ comporte un seul site $^{23}$Na [33]**.** Le spectre $^{23}$Na MAS (5 kHz) de ce composé est présenté sur la Figure 3-13. Un découplage {$^1$H} de type SPINAL-64 [34], [35] est utilisé durant l'acquisition du signal afin d'obtenir la meilleure résolution possible (tout particulièrement à faible fréquence de rotation MAS). Le spectre est constitué : d'une unique transition centrale (CT) élargie par l'effet quadripolaire au second-ordre, des bandes de rotation de la transition centrale et des peignes de bandes de rotation des deux transitions satellites (ST). L'ensemble du spectre peut être simulé de manière très satisfaisante à l'aide des paramètres suivants : $\delta_{iso}(^{23}Na)$ = 2,40 ppm, $C_Q(^{23}Na)$ = 1,86 MHz, $\eta_Q(^{23}Na)$ = 0,33. La simulation peut être effectuée à partir du spectre MAS complet. Lorsque la fréquence de rotation augmente de 5 à 20 kHz, on note une légère variation de $\delta_{iso}(^{23}Na)$ (de l'ordre de – 0,35 ppm). Cette variation est réversible.

Lors de notre présentation de l'approche calculatoire GIPAW appliquée aux phases d'oxalate de calcium hydraté (voir partie 4.c).), nous reviendrons sur ces variations subtiles des paramètres RMN en fonction de la température.

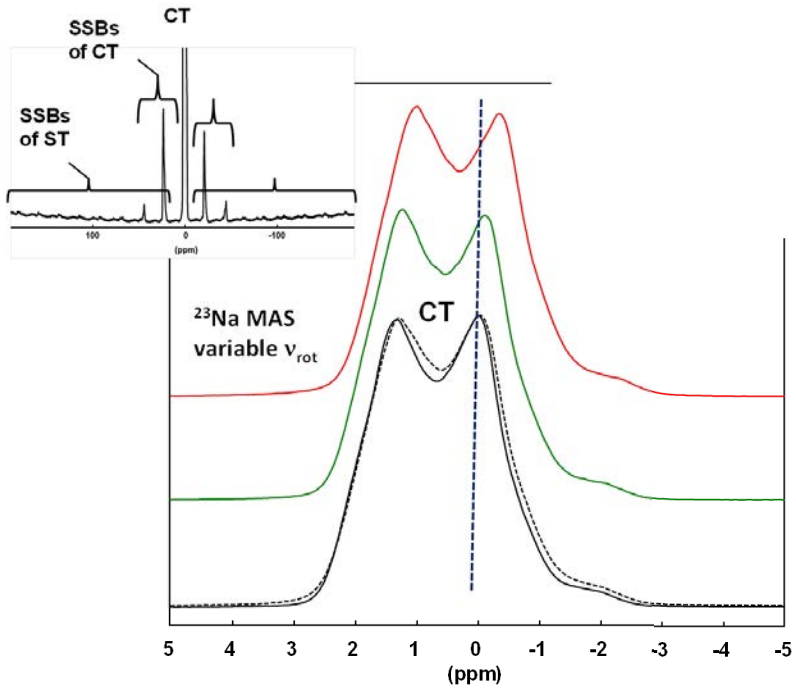



**Figure 3-13 : Spectres $^{23}$Na MAS (transition centrale) de la phase $NaHC_2O_4 \cdot H_2O$ (spectromètre 850 MHz, sonde MAS 3,2 mm HX). La fréquence de rotation MAS est variable : 5 kHz (en noir, trait continu), 10 kHz (en vert), 20 kHz (en rouge), retour à 5 kHz (en noir, trait pointillé). Insert en haut à gauche : spectre MAS complet mettant en évidence la transition centrale (CT) et les transitions satellites (ST).**

### *iii. Effets de la diminution de température*

Le comportement des phases d'oxalate de calcium hydraté a été également étudié à plus basse température (jusqu'à – 30°C), en utilisant un spectromètre 700 MHz. Dans ce cas, la température a été régulée à l'aide du module BCUX. Les spectres $^{13}$C CP MAS de la phase COT sont présentés en fonction de la température (mesuré par la BCUX) sur la Figure 3-14. La fréquence de rotation est modérée (10 kHz) de façon à ne mettre en évidence que des effets dus à la température (voir ci-dessus). De manière remarquable, on observe de très faibles variations de déplacement chimique pour un *seul* des pics attribués au COT. La variation de ce déplacement chimique particulier est estimée à + 0,0028 ppm.K$^{-1}$ sur cette gamme de température. Une telle valeur n'est pas suffisante pour utiliser le COT comme "thermomètre" interne. A titre comparatif, nous avons joint à la Figure 3-14 un spectre $^{13}$C CP MAS de la phase COT obtenu à ~ 100 K (au cours d'une expérience de DNP CP MAS – voir la partie 4 de ce Chapitre) (nous précisons que le pic le plus déblindé a été volontairement centré sur 169,46 ppm). Nous confirmons ici que l'écart relatif entre les deux résonances augmente lorsque la température de l'échantillon diminue.

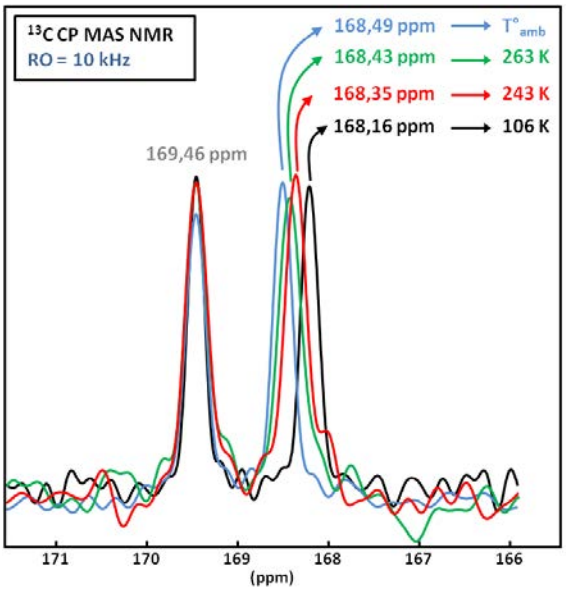



**Figure 3-14 : Spectres $^{13}$C CP MAS (700 MHz) de la phase COT (fréquence de rotation : 10 kHz) en fonction de la température : de la température ambiante à -30°C. Le spectre en noir a été enregistré à -167°C lors d'une expérience de DNP CP MAS (400 MHz et fréquence de rotation : 8 KHz – voir partie 4 a).).**

Ces variations relatives de signaux sont également observables avec le COM : plus la température décroît, plus les deux signaux au centre vont se déplacer l'un vers l'autre jusqu'à se croiser à très basse température (100 K) (Figure 3-15) ; le signal total gagne légèrement en largeur (les raies s'élargissent légèrement et la gamme de déplacement chimique des 4 pics du COM augmente grandement). Cela a été observé dans le cadre de la DNP comme nous le verrons plus tard.

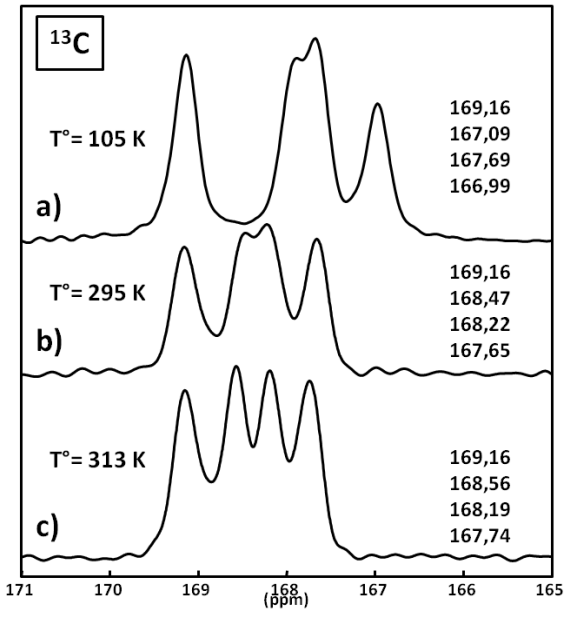



**Figure 3-15 : a) spectre $^{13}$C CP DNP MAS (400 MHz) de la phase COM (fréquence de rotation : 8 kHz) T°= 105 K. b) spectre $^{13}$C CP MAS (700 MHz) de la phase COM (fréquence de rotation : 10 kHz) T°= 295 K et c) spectre $^{13}$C CP MAS (700 MHz) de la phase COM (fréquence de rotation : 10 kHz) T°= 313 K.**

Le pic le plus déblindé de chacun des spectres de la Figure 3-15 a été volontairement centré à 169,78 ppm.

Nous avons démontré que la RMN $^{13}C$ CP MAS était un outil particulièrement adapté à la caractérisation très détaillée des structures de COM, COD et COT. De manière inattendue, la rotation MAS permet de décrire *in situ* les transformations des phases, COD vers COM et COT vers COM. En utilisant KBr comme étalon interne pour la mesure en température, les effets de température et de pression ont été décorrélés dans la mesure du possible. A température peu élevée, COD et COT se transforment donc spontanément en COM, la phase la plus stable thermodynamiquement (cette dernière remarque est particulièrement vraie pour COT). Ces observations sont en accord avec les données cliniques relatives aux calculs rénaux, montrant que la phase COM est surreprésentée alors que la phase COT est quasiment absente.

Nous avons également montré que la phase dite COM est de fait beaucoup plus compliquée que prévu lors de l'analyse d'échantillons synthétiques ou de COM obtenu après transformation *in situ* des phases COD et COT. Malgré les diffractogrammes de rayons X et des spectres FTIR identiques, les spectres $^{13}C$ CP MAS des échantillons de COM (provenant de différentes synthèses) sont distincts. De manière générale, 4 résonances résolues sont observées (de légers décalages de quelques fractions de ppm peuvent être mis en évidence), superposées à deux résonances plus larges et dont les valeurs de $\delta_{iso}(^{13}C)$ sont compatibles avec ceux d'une composante de type ACO.

## 2. Autour de l'hydroxyapatite (HAp) et des HAp substituées

La littérature concernant la famille des hydroxyapatites synthétiques, et plus généralement des phosphates de calcium, est largement documentée [36]. A n'en pas douter, l'engouement des chercheurs pour ce domaine est à relier à l'importance fondamentale de ces composés chimiques dans le domaine biologique. Rappelons que l'hydroxyapatite substituée (dite apatite "biologique" dans ce cas) est un des constituants majeurs des os et des dents chez les mammifères. Les substituants sont tout à la fois de nature anionique ($F^-$, $CO_3^{2-}$, $SiO_4^{4-}$,…) que cationique ($Na^+$, $K^+$, $Mg^{2+}$, …). Il en résulte une grande variabilité dans les mécanismes de compensation de charges conduisant à une caractérisation détaillée des structures particulièrement délicates. Dans un ouvrage récent entièrement consacré à la substitution de l'HAp par les ions carbonates [37], Fleet montre que, même dans ce cas très particulier (et largement simplifié par rapport à la réalité des apatites "biologiques"), la complexité structurale est induite par la présence de plusieurs sites de substitutions possibles pour les anions carbonates : les *sites A* ($OH^-$) et les *sites B* ($PO_4^{3-}$) (voir Chapitre 1). Dans la suite du manuscrit, nous serons également amenés à étudier des HAp partiellement substituées par des ions $Na^+$. Une fois encore, un degré de liberté est observé : les cations peuvent remplacer les atomes de calcium Ca(I) et/ou Ca(II). Fleet[38] mentionne les spectroscopies vibrationnelles (FTIR et diffusion Raman), ainsi que les techniques de diffractions (des rayons X et des neutrons) comme techniques de caractérisation les plus développées pour l'étude des phases apatitiques. Il n'est fait mention que très brièvement des méthodes de RMN en phase solide.

La RMN $^{31}P/^{1}H$ MAS et CP MAS ont tout d'abord été largement utilisées du fait de la sensibilité intrinsèque élevée de ces deux noyaux [39]–[42]. Dès 1980, Yesinowski et *coll.* proposent une analyse en température d'HAp stœchiométrique et non-stœchiométrique [43] grâce à des méthodes de RMN à l'état solide en phosphore-31. Plus récemment, les travaux de Gras et *coll.* [44] montrent la facilité d'analyse de pyrophosphates de calcium amorphes par $^{31}P$ RMN. L'expérience 2D $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$

HETCOR CP MAS a également été un outil de choix pour la caractérisation de la couche apatitique dite "amorphe" qui entoure les cœurs cristallisés des nano-apatites présentes dans l'os et les apatites biométiques de synthèse [45], [46]. Toutes les expériences évoquées ci-dessus sont reliées à la caractérisation du "squelette" apatitique. L'étude des substituants anioniques et cationiques a été également envisagée par RMN multinucléaire et multidimensionnelle. Nous citons ci-dessous quelques exemples d'études qui nous seront utiles par la suite (sans volonté d'exhaustivité) : ***(i)*** Beshah *et coll.* [40] démontrent que les carbonates en sites A peuvent être distingués des carbonates en site B par RMN $^{13}C$ MAS et CP MAS en abondance naturelle *via* la donnée du déplacement chimique isotrope (les carbonates en sites A sont caractérisés par $\delta_{iso}(^{13}C)$ = 166,6 ppm, ce qui correspond systématiquement à la résonance la plus blindée), ***(ii)*** Mason *et coll.* [47] présentent des expériences 2D $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ HETCOR CP MAS et $^{23}Na\{^{31}P\}$ TRAPDOR MAS en utilisant des échantillons *enrichis* en $^{13}C$. Nous utiliserons également cette approche (enrichissement isotopique) par la suite, ***(iii)*** Gasquères *et coll*. [48] identifient de façon non ambigüe les anions silicates présents au sein de la structure apatitique (unités $Q^0$) en modifiant la séquence standard $^{1}H \rightarrow {}^{29}Si$ CP MAS par l'ajout d'un filtre $T_{1\rho}(^{1}H)$. Par ailleurs, les auteurs mettent également en évidence une quantité importante ($\sim$ 80 %) d'unités condensées $Q^3$ et $Q^4$ (silice amorphe hydratée) se situant en dehors de la matrice apatitique.

Toutes les études présentées ci-dessus tendent à démontrer que l'étude des substitutions est particulièrement ardue en terme de sensibilité lorsque les composés sont étudiés en *abondance naturelle* pour des noyaux tels que $^{13}C$ et $^{29}Si$. La faible abondance naturelle est un problème en soi, auquel il faut rajouter le fait que les substituants correspondent généralement à un faible pourcentage massique du composé choisi. Ainsi, dans le cas des carbonates, les pourcentages massiques observés dans les apatites "biologiques" sont de l'ordre de $\sim$ 5 % (en carbonates) et $\sim$ 1 % en C ! Il en résulte que les expériences de RMN 2D ne peuvent être envisagées qu'après enrichissement isotopique.

Dans la suite de cette section, nous présentons quelques caractéristiques classiques d'hydroxyapatites substituées par des ions carbonates $Na^+$, en gardant en mémoire les problèmes intrinsèques de sensibilité des expériences de RMN $^{13}C$. Les hydroxyapatites ainsi étudiées nous serviront de composés de référence pour la mise au point des expériences de DNP MAS qui modifieront profondément notre perception de la sensibilité en RMN (voir parties 3 et 4 de ce Chapitre). Les synthèses des nanoparticules d'HAp substituées sont présentées dans le Chapitre 1 partie 2 c). ii.

### a) Approche par RMN $^{1}H$, $^{31}P$ et $^{13}C$ MAS/CP MAS en phase solide

La famille des HAp a été très largement étudiée par RMN $^{1}H$ MAS et ultra-fast MAS, à champ magnétique modéré et à ultra haut champ. Le spectre $^{1}H$ MAS de HAp (sans substitutions, de symétrie hexagonale) est présenté sur la Figure 3-16a. Le spectre est caractérisé par une résonance fine (à l'échelle de l'expérience $^{1}H$ en phase solide) centrée à 0,0 ppm. Celle-ci correspond aux groupements hydroxyles de la structure HAp, situés dans des canaux parallèles à l'axe *c* (voir Chapitre 1 partie 2 c). ii.). Il s'agit d'une signature très caractéristique qui nous sera très utile en DNP MAS pour évaluer de manière précise le gain DNP, $\varepsilon_{DNP}$. La géométrie particulière des colonnes d'ions $OH^-$ conduit probablement à un processus de diffusion de spin (SD) $^{1}H$ quasi-unidirectionnel. En effet, les données cristallographiques indiquent que les colonnes peuvent être considérées

comme « isolées » : la distance la plus courte entre deux colonnes consécutives est de ~ 9 Å. L'interaction dipolaire homonucléaire $^{1}H–^{1}H$ est donc maximale pour des $OH^-$ adjacents au sein de la *même* colonne (distance O–H···O : ~ 3,33 Å). Cette unidirectionnalité a été mise à profit par Yesinowski *et coll.* [49] pour la création de cohérences multi-quanta $^{1}H–^{1}H$ et par un groupe du MIT dans le cadre du Quantum Computing appliqué à la RMN en phase solide.

D'un point de vue expérimental, on observe une diminution progressive de la largeur de raie en fonction de la fréquence de rotation MAS, de 5 à 67 kHz. Cela tend à prouver que la SD est progressivement supprimée au fur et à mesure de la montée en fréquence de rotation. Nous notons ici que dans un article très récent, Klimavicius *et coll.* prouvent par des expériences très détaillées que la rotation MAS à fréquence modérée (< 9 kHz) a peu d'impact sur la SD $^{1}H$-$^{1}H$ dans le cas d'HAp nanostructurée [50]. Cette remarque est très importante en vue des expériences DNP MAS décrites dans la partie 3 de ce Chapitre.

Une résonance centrée à ~ 5 ppm est attribuée à des molécules d'eau adsorbées en surface des nanoparticules d'HAp. On remarque également la présence de résonances de faible intensité à ~ 1 ppm. Celles-ci sont quasi-systématiquement observées sur de nombreux échantillons synthétiques. Elles ont donné lieu à de nombreuses interprétations dans la littérature. Millot *et coll*. [51], dans un article récent, proposent des attributions réalistes des protons vers 1 ppm. Ces derniers les attribuent à des molécules d'eau de surface orientées (« up » ou « down »), alignées avec les colonnes d'$OH^-$. Le signal à ~ 0 ppm est, quant à lui, attribué aux différents $OH^-$ de la structure (et de la surface).

Enfin, on note un élargissement de la résonance à 0,0 ppm en présence d'ions carbonates en substitution (Figure 3-16b) (l'échantillon sera noté CHAp dans la suite du document). Un léger épaulement situé à des déplacements chimiques négatifs est également bien mis en évidence. Nous attribuons cette élargissement global à une distribution de déplacements chimiques consécutive à la substitution de certains sites A et/ou B de la structure.

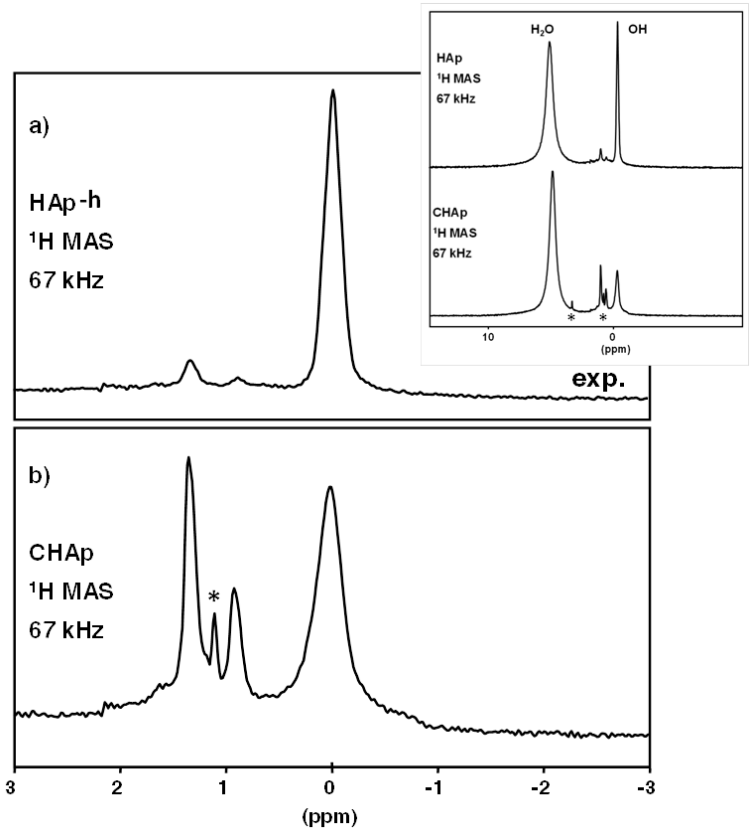



**Figure 3-16 : a) spectre $^{1}$H ultra fast MAS (67 kHz) (obtenu à 500 MHz) de nanoparticules d'apatite obtenues par précipitation en voie aqueuse et b) spectre ultra fast $^{1}$H ultra fast MAS (67 kHz) (obtenu à 500 MHz) de nanoparticules d'HAp carbonatée (CHAp) (voir la synthèse dans le Chapitre 1). Insert : spectres complets montrant la résonance attribuée à $H_2O$. HAp-h : phase hexagonale.**

La RMN $^{31}$P MAS/CP MAS est une technique très employée pour la caractérisation des apatites. La Figure 3-17a présente le spectre $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$ CP MAS de l'HAp (nanométrique), de symétrie *hexagonale* notée *h* sur la Figure 3-17 (groupe d'espace **$P6_3/m$**). Une unique résonance centrée sur 2,80 ppm est observée à une fréquence MAS de 14 kHz. Après substitution partielle par des carbonates, le spectre $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$ CP MAS obtenu est présenté sur la Figure 3-17b. On note une fois encore un élargissement important de la raie de résonance et un léger décalage à 3,30 ppm (deshielding). Ce décalage est systématiquement observé dans le cas des nanoparticules d'HAp substituées. On note également de légères modifications entre les spectres $^{31}$P MAS et CP MAS pour les deux types d'échantillons (carbonaté ou non) (un seul temps de contact a été utilisé). Enfin l'HAp peut exister sous un autre polymorphe de symétrie monoclinique (groupe d'espace **$P2_1/b$**). Trois résonances sont alors mises en évidence en accord avec les données cristallographiques. Les phases hexagonale et monoclinique se distinguent cristallographiquement par des agencements différents des groupements hydroxyles au sein des colonnes parallèles à l'axe *c*.

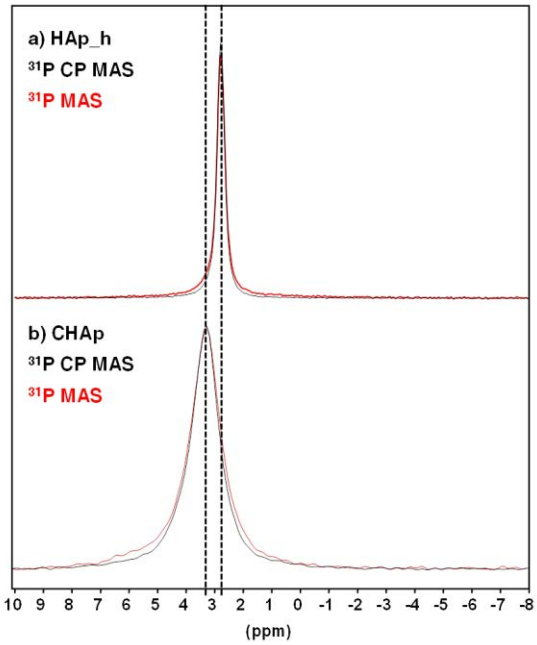



**Figure 3-17 : a) spectres $^{31}$P MAS (rouge) et CP MAS (noir) de nanoparticules d'HAp obtenues par précipitation en voie aqueuse. RO = 14 kHz et b) ) spectres $^{31}$P MAS (rouge) et CP MAS (noir) de nanoparticules carbonatées (CHAp) obtenues par précipitation en voie aqueuse. HAp-h : phase hexagonale.**

Nous concluons cette section en présentant le spectre $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ CP MAS de l'échantillon carbonaté CHAp. Comme dans le cas des oxalates de calcium (voir ci-dessus), les résonances isotropes $^{13}$C sont toutes rassemblées sur une faible gamme de déplacements chimiques : de 166,0 à 172,0 ppm. En vue de donner la description la plus précise des distributions en sites A et B, il apparaît donc que la résolution spectrale est un critère essentiel de réussite. Cela sous-entend bien sûr un réglage optimisé des shims de la sonde RMN considérée et de l'angle magique. Du point de vue de la préparation de l'échantillon, nous avons opté pour un traitement des nanoparticules de CHAp à 400°C (voir Chapitre 1 partie 2) : un tel traitement conduit à l'obtention de spectres plus résolus qu'en absence de traitement. Signalons ici un point très important : le spectre présenté sur la Figure 3-18 correspond à un échantillon CHAp enrichi en $^{13}$C ($NaH^{13}CO_3$, enrichi à 100 %, a été utilisé comme précurseur de synthèse). Un rapport signal/bruit tout à fait convenable est obtenu. Le spectre est caractérisé par 4 (voire 5) résonances isotropes centrées sur : $\delta_{iso}(^{13}C)$ = 166,5 ; 168,3 ; 170,1 et 171,1 ppm. Des expériences $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ CP MAS à temps de contact variable ont été effectuées pour CHAp et le composé de référence $NaHCO_3$ (présentant des groupements hydrogénocarbonates). La dynamique de polarisation croisée est nettement plus lente dans le cas de CHAp, pour toutes les résonances observées. Nous en déduisons que la quantité de groupement $HCO_3^-$ est négligeable dans CHAp.

D'après Beshah *et coll.* [40], la résonance la plus blindée correspond aux carbonates en sites A (en substitution de certains groupes $OH^-$). Les autres résonances correspondent aux carbonates en sites B sachant que plusieurs d'entre eux ont été bien décrits par De Leeuw *et coll*. [52]. Dans le cas de structures de type CHAp, les auteurs identifient ainsi des sites : AB (où le site de substitution B est proche d'un site A substitué également), B-Na (site B proche d'un cation $Na^+$) et B-OH (site B proche d'un groupement $OH^-$). Tous ces résultats sont obtenus par minimisation de l'énergie des structures par calculs de type DFT. Ces considérations seront reprises dans la suite du manuscrit, lors de la discussion sur les expériences DNP MAS.

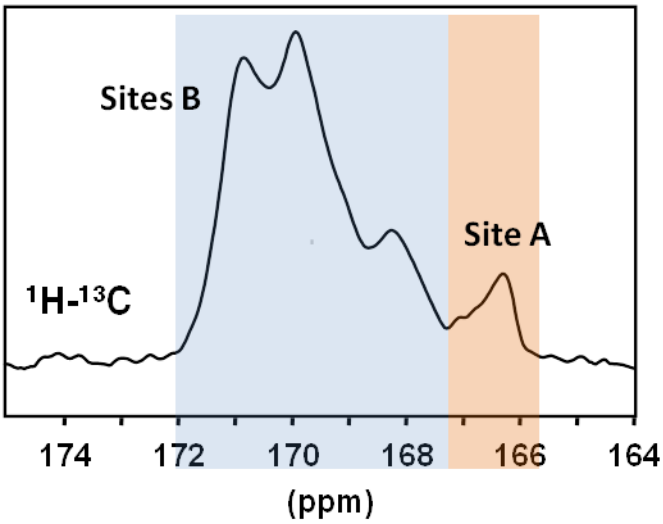



**Figure 3-18 : Spectre $^{13}C$ CP MAS de CHAp (sonde 3,2 mm, 700 MHz) (ce spectre correspond à la projection d'une expérience $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ HETCOR CP MAS). Sites A et B d'après** [40].

### b) Noyaux quadripolaires : RMN $^{23}Na$ et $^{43}Ca$ MAS en phase solide

Rappelons tout d'abord que l'échantillon CHAp étudié dans cette section a été synthétisé à l'aide du précurseur $NaH^{13}CO_3$. Il est acquis dans la littérature que le sodium peut partiellement remplacer certains des ions calcium de la structure Hap [36]. Des apatites sodées ont été largement décrites par Fleet [37] et caractérisées par FTIR et diffraction des rayons X sur poudre. Mason *et coll.* [47] ont également étudié une apatite partiellement sodée par RMN $^{23}Na\{^{31}P\}$ TRAPDOR MAS démontrant de manière convaincante que les ions sodium étaient bien présents à l'intérieur du squelette inorganique apatitique (déphasage conséquent des résonances $^{31}P$ en présence d'impulsions $^{23}Na$ indiquant des distances faibles entre noyaux $^{31}P$ et $^{23}Na$ et des interactions dipolaires hétéronucléaires $^{31}P–^{23}Na$ conséquentes). Nous reviendrons sur ce point lors des études en $^{23}Na$ DNP CP MAS (voir section 3.b).).

Comme dans le cas des oxalates de calcium hydratés (voir paragraphe 1.a).iii.), il est possible d'obtenir des spectres $^{43}Ca$ MAS des échantillons d'HAp en *abondance naturelle*. L'approche expérimentale est la même que celle présentée ci-dessus (ultra haut champ magnétique et rotor de gros volume) [53]**.** A ultra-haut champ magnétique (ici 20 T), il est possible de quasiment résoudre les 2 sites, Ca(I) et Ca(II), décrits au niveau de la structure cristallographique. Cela vient du fait que les constantes quadripolaires sont faibles pour les deux sites (< 3 MHz). Les deux valeurs de $\delta_{iso}(^{43}Ca)$ sont 11,2 et −1,8 ppm [54]. On notera que les sites Ca(II) sont positionnés près des groupes hydroxyles des colonnes de la structure. Ce point aura son importance lorsque nous aborderons l'étude de CHAp par RMN $^{1}H \rightarrow {}^{43}Ca$ DNP CP MAS à basse température (voir section 3.d).). Le spectre $^{23}Na$ MAS de CHAp est tout à fait comparable à celui obtenu par Mason *et coll.*[47] .

## 3. Augmentation de sensibilité par DNP MAS : mise en place des protocoles expérimentaux à partir de CHAp

Nous abordons ici le cœur de ce travail de thèse. En effet, nous avons précisé précédemment que dans le cas de l'étude des hydroxyapatites substituées, la *sensibilité* de l'expérience RMN était un facteur particulièrement limitant. Il en est *a priori* de même dans le cas des échantillons de très faible masse comme les plaques de Randall. Au cours du Chapitre 2, nous avons détaillé brièvement les avancées récentes en matière de DNP MAS à haut/très haut champ magnétique. Nous avons en particulier insisté sur l'aspect prépondérant de la *préparation de l'échantillon*, sachant que nous nous sommes systématiquement orientés vers la méthode d'imprégnation de l'échantillon par une solution d'un biradical donné. A notre connaissance, aucun travail préparatoire n'avait été proposé concernant l'étude par DNP MAS de l'hydroxyapatite. Notre démarche, qui correspond globalement aux points abordés dans la suite de cette section, a été la suivante :

- ***(i)*** Optimisation, dans le cas de CHAp, de ce que B. Griffin nomme désormais le « DNP juice », à savoir un solvant adéquat (classiquement un mélange d'espèces protonées et deutérées) et un biradical (soluble dans ce mélange).
- ***(ii)*** Optimisation des expériences double- et triple résonances $^{1}H \rightarrow X/Y$ DNP CP MAS (X, Y = $^{13}C$, $^{23}Na$, $^{31}P$) à l'aide d'un échantillon CHAP *enrichi* en $^{13}C$.
- ***(iii)*** Extension à des échantillons CHAp étudiés en *abondance naturelle* $^{13}C$.
- ***(iv)*** Développement et mise au point des expériences $^{1}H \rightarrow {}^{43}Ca$ DNP CP MAS *en abondance naturelle*, à partir de CHAp.
- ***(v)*** Extension de l'approche DNP CP MAS aux phases synthétiques d'oxalates de calcium hydratés COM, COD et COT.
- ***(vi)*** Premiers résultats obtenus dans le cas de la plaque de Randall et des échantillons de calculs rénaux. Les points ***(v)*** et ***(vi)*** seront abordés dans la partie 4 de ce Chapitre, ainsi que dans le Chapitre 4, respectivement.

### a) Choix du solvant et du biradical (« DNP juice »)

L'échantillon test correspond ici à CHAp. Nous rappelons qu'il s'agit de nanoparticules d'HAp carbonatées obtenues par précipitation en voie aqueuse, et traitées thermiquement à 400°C. Dans un premier temps, nous avons choisi volontairement d'utiliser une source de carbonates enrichie à 100 % en $^{13}C$ (ici, $NaH^{13}\underline{C}O_3$). Ce choix nous a permis d'optimiser plusieurs paramètres expérimentaux (spin lock durant l'expérience CP, délai de relaxation *via* des mesures systématiques de $T_1(^1H)$, puissance microonde…) en un temps limité.

Notre choix du solvant a été guidé par une réflexion simple (*a priori*), à savoir qu'*in vivo*, les plaquettes nanométriques d'HAp sont en interaction forte avec les molécules d'eau des fluides biologiques [46]. Le solvant $D_2O/H_2O$ (9/1) est donc privilégié (le rapport $D_2O/H_2O$ est identique à celui préconisé par Griffin *et coll*.). Deux biradicaux d'intérêt sont compatibles avec l'eau : le TOTApol [55] et l'AMUpol [56]. Dans la littérature, il est désormais admis que l'efficacité DNP de l'AMUpol, mesurée très simplement par le paramètre $\varepsilon(X)_{ON/OFF}$ où X est le noyau d'intérêt (voir ci-dessous), est généralement plus élevée que celle du TOTApol (le rapport $D_2O/H_2O$ étant fixé par ailleurs). A ce stade**, nous précisons qu'aucun additif cryoprotecteur, tel que le glycérol, n'a été ajouté au mélange formé du solvant et de biradical.** Nous opterons pour cette solution dans la

cadre de l'étude de CHAp par $^{1}H \rightarrow {}^{43}Ca$ DNP CP MAS en abondance naturelle (voir paragraphe 3.d).).

Pour l'étape d'*imprégnation* de l'échantillon par le solvant, environ 30 mg de CHAp sont mis en contact avec 15 µL d'une solution $D_2O/H_2O$ (9/1) de TOTApol (20 mmol.$L^{-1}$) ou d'AMUpol (15 mmol.$L^{-1}$). Le mélange obtenu doit avoir l'aspect d'une pâte peu fluide : cette étape est fondamentale pour la réussite de l'expérience DNP … elle reste à ce jour fondamentalement empirique ! La pâte ainsi obtenue est ensuite placée dans un rotor en saphir (3,2 mm), qui est alors rapidement refroidi à une température d'environ 100 K. Des pesées précises du rotor avant et après remplissage permettent d'estimer la quantité d'échantillon effectivement étudiée (ici $\sim$ *16,5 mg*). La fréquence de rotation MAS sera systématiquement fixée à 8 kHz. Il s'agit d'un bon compromis, permettant tout à la fois de moyenner les interactions RMN telles que dipolaires et CSA, et d'éviter des effets trop importants de *dépolarisation* (voir Chapitre 2) [57], [58]. Le champ magnétique utilisé est de 9,4 T (400 MHz). La puissance microonde peut être ajustée par la donnée du collecteur de courant (*collector current*, de 30 à 50 mA). En présence de puissance microonde (*collector current* : 50 mA) la température de l'échantillon est de 111 K, alors qu'elle était de 102 K en absence d'irradiation microonde. En d'autres termes, il n'est pas judicieux d'augmenter outre mesure la puissance microonde : l'élévation locale de température conduit en effet à une diminution de l'efficacité DNP. De fait, ce paramètre ne sera plus optimisé par la suite. Classiquement, deux mesures de RMN $^{1}H$ DNP MAS sont alors effectuées : ON (en présence d'irradiation microonde) et OFF (en absence d'irradiation microonde). Le rapport $\varepsilon(^{1}H)_{ON/OFF}$ correspond au rapport des intensités observées lors de ces deux expériences. Nous utiliserons très régulièrement la valeur de $\varepsilon(X)_{ON/OFF}$ pour évaluer l'efficacité du transfert DNP vers un noyau X donné. Nous rappelons ici qu'un paramètre plus représentatif de cette efficacité est donné par l'ASR (Absolute Sensitivity Ratio) (voir Chapitre 2) [59]. Parfois, nous calculerons l'ASR de façon à estimer le gain réel en temps expérimental ($\sim ASR^2$). Notons que $\varepsilon(X)^2_{ON/OFF}$ donne déjà un ordre de grandeur réaliste. En conditions ON, les temps de relaxation $T_1(^{1}H)_{ON}$ sont mesurés par saturation-récupération (parfois, un écho de Hahn synchronisé avec la fréquence de rotation est utilisé de façon à minimiser les distorsions de ligne de base). Le délai de relaxation ($^{1}H$) de l'expérience DNP CP MAS est alors fixé à : $1{,}3 \times T_1(^{1}H)_{ON}$.

La Figure 3-19a présente les spectres $^{1}H$ DNP MAS (ON et OFF) et pour les deux biradicaux choisis, TOTApol et AMUpol. Nous observons tout d'abord que la résonance attribuée aux groupes hydroxyles des $OH^-$ des colonnes de la structure est bien mise en évidence (volontairement positionnée à 0,0 ppm), séparément du signal large attribué au solvant. Ceci nous permet de mesurer indépendamment $\varepsilon(^{1}H)_{ON/OFF}$ pour le solvant et pour l'échantillon d'HAp. Dans les deux cas, $\varepsilon(^{1}H)_{ON/OFF} \sim 10$. Cette valeur n'est pas exceptionnelle en soi par rapport aux données de la littérature mais elle dénote un effet DNP net. Comme anticipé grâce aux résultats de la littérature, l'utilisation de l'AMUpol conduit à $\varepsilon(^{1}H)_{ON/OFF} \sim 23$. Ce gain est très conséquent : il correspond à un gain en temps expérimental de l'ordre de 530 ! Les valeurs de $T_1(^{1}H)_{ON}$ sont très comparables pour le solvant (5,7 s) et CHAp (6,5 s). Nous reviendrons plus en détails sur ce point dans le paragraphe 3.d)., consacré à l'expérience $^{1}H \rightarrow {}^{43}Ca$ DNP CP MAS. De façon très intéressante, les valeurs de $\varepsilon(^{13}C)_{ON/OFF}$ et $\varepsilon(^{31}P)_{ON/OFF}$ sont également de 23 (Figure 3-19b et Figure 3-19c). La résolution obtenue en DNP $^{13}C$ CP MAS (voir insert de la Figure 3-19b) est tout à fait acceptable pour un spectre obtenu à 400 MHz (nous rappelons que le spectre $^{13}C$ CP MAS présenté sur la Figure 3-18 ci-dessus a été obtenu à l'aide

d'un spectromètre 700 MHz). Il est aisé de distinguer les carbonates en sites A des carbonates en sites B. On remarque également que l'intensité du spectre $^{13}C$ en condition OFF est somme toute « assez intense » (pour un temps expérimental de l'ordre de 2 minutes). Cela est du au fait que CHAp est ici enrichie en $^{13}C$. Il va sans dire qu'en abondance naturelle, une telle sensibilité ne pourrait pas être atteinte en condition OFF (voir ci-dessous). On rappelle également qu'à 100 K, le gain en sensibilité est de l'ordre de 3 par rapport à des expériences faites à température ambiante. Enfin, on notera sur l'insert de la Figure 3-19c que les spectres $^{31}P$ normalisés en conditions ON et OFF sont strictement comparables.

Les observations décrites ci-dessus nous conduisent à penser que l'expérience DNP MAS est capable de "détecter la totalité" des sites des nanoparticules de CHAp ($\varepsilon(^1H)_{ON/OFF} \sim \varepsilon(^{13}C)_{ON/OFF} \sim \varepsilon(^{31}P)_{ON/OFF} \sim 10$ pour le TOTApol et $\sim 23$ pour l'AMUpol), sans donner de poids particulier aux sites de surface (spectres $^{13}C$ et $^{31}P$ ON et OFF identiques). Nous attribuons ces observations au fait que les particules de CHAp sont nanométriques et que la diffusion de spins $^1H$–$^1H$ est efficace le long des colonnes de $OH^-$. Bien entendu, cette affirmation ne sera plus justifiée dans le cas d'objets micrométriques pour lesquels la DNP est particulièrement sensible aux espèces en surface (d'où la dénomination SENS, *Surface Enhanced NMR Spectroscopy*, introduite par Emsley *et coll*. à partir de 2010 [60]).

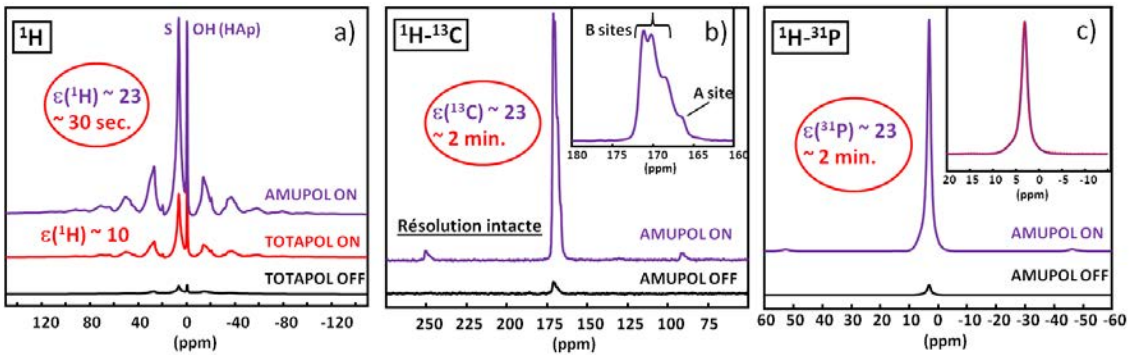



**Figure 3-19 : Spectres DNP MAS et CP MAS de CHAp en utilisant les mélanges TOTApol/$D_2O$/$H_2O$ (9/1) (en rouge) et AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ (9/1) (en violet) . a) $^1H$ DNP MAS. b) $^{13}C$ DNP CP MAS. c) $^{31}P$ DNP CP MAS. OFF (spectres en noir) : pas d'irradiation microonde. ON : irradiation microonde. Insert b) : observation des résonances des sites A et B. Insert c) : Comparaison des spectres $^{31}P$ en conditions ON et OFF (normalisés).**

En conclusion, nous avons démontré que l'échantillon CHAp, *enrichi* à 100 % en $^{13}C$, était un composé de choix pour le développement des expériences $^1H \rightarrow X$ DNP CP MAS (X = $^{13}C$, $^{31}P$). Le radical le plus efficace ici est l'AMUpol (20 mmol.$L^{-1}$) en solution aqueuse dans un mélange $D_2O/H_2O$ (9/1). Dans de telles conditions optimisées, nous obtenons : $\varepsilon_{ON/OFF} \sim 23$ pour les trois noyaux $^1H$, $^{13}C$ et $^{31}P$. Une telle valeur de l'effet DNP autorise la mise en place d'expériences double et triple résonances, 1D et 2D hétéronucléaires (HETCOR) et homonucléaires (SPC5).

Bien entendu, notre but ultime étant d'étendre les expériences de DNP CP MAS à l'étude de composés naturels (calcifications pathologiques et plaques de Randall), nous avons poursuivi la mise en place de telles expériences dans le cas de composés CHAP en *abondance naturelle* pour le $^{13}C$. La synthèse mise en jeu est strictement identique à celle de l'échantillon CHAp enrichi, le précurseur étant alors $NaHCO_3$. Les résultats obtenus par $^1H$ DNP MAS et $^1H \rightarrow {}^{13}C,{}^{31}P$ DNP CP MAS sont présentés sur la Figure 3-20. Ceux-ci comparent les expériences en *abondance naturelle* et après enrichissement en $^{13}C$. Les spectres $^1H$ et $^{31}P$ sont superposables, ce qui était attendu *a priori*. Dans le cas du $^{13}C$, l'effet de l'enrichissement est très net. *Cependant, le résultat essentiel est que le signal*

*obtenu en abondance naturelle, après* ***2 minutes*** *(!) d'acquisition, est significatif.* Nous verrons par la suite qu'il est même possible d'envisager des expériences 2D de type HETCOR, alors que ceci serait tout simplement irréalisable en utilisant les méthodes standards de RMN. *A notre sens, ce résultat est majeur*.

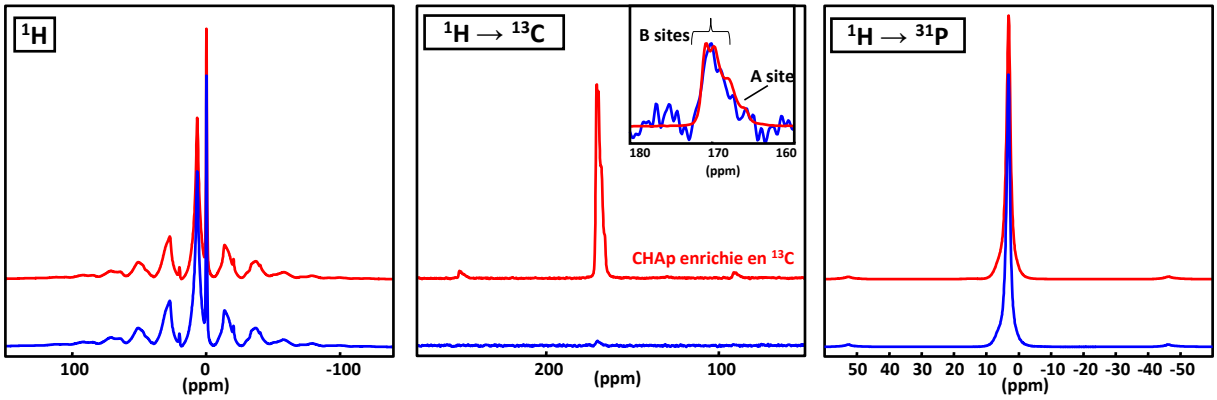



**Figure 3-20 : Spectres DNP MAS et CP MAS, *en abondance naturelle $^{13}$C* (spectres bleus), et *après enrichissement en $^{13}$C* (spectres rouges) de CHAp, et en utilisant le mélange AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ (9/1). a) $^{1}$H DNP MAS. b) $^{13}$C DNP CP MAS. c) $^{31}$P DNP CP MAS. Tous les spectres présentés sont obtenus en présence d'irradiation microonde (ON). Les spectres $^{13}$C sont obtenus en 2 minutes environ.**

### b) Expériences 2D DNP CP MAS double et triple résonances

■ La sonde Bruker DNP MAS utilisée ici est une sonde à trois canaux {$^{1}$H, X, Y}. Pour X = $^{31}$P, nous avons exploré les expériences suivantes : Y = $^{13}$C et $^{23}$Na (expériences triple résonances). Nous avons également envisagé la combinaison X = Y = $^{13}$C (expérience double résonances). Dans certaines expériences, le TOTApol a été utilisé comme biradical. Pour les expériences 2D en revanche, le choix se porte logiquement sur l'utilisation de l'AMUpol qui a montré une efficacité DNP accrue par rapport au TOTApol. CHAP (enrichie en $^{13}$C) a été utilisé une fois encore comme composé de référence.

La première expérience envisagée a été une corrélation triple résonances de double polarisation croisée, $^{1}$H ⟶ $^{31}$P ⟶ $^{13}$C (voir Chapitre 2). A notre connaissance, une telle approche n'a jamais été reportée dans la littérature, y compris dans le cas de conditions de RMN standard. L'intérêt premier de l'approche réside dans le fait que le spectre $^{13}$C enregistré est *édité* par l'interaction dipolaire hétéronucléaire $^{13}$C–$^{31}$P conduisant à des informations sur les distances internucléaires d($^{31}$P–$^{13}$C).

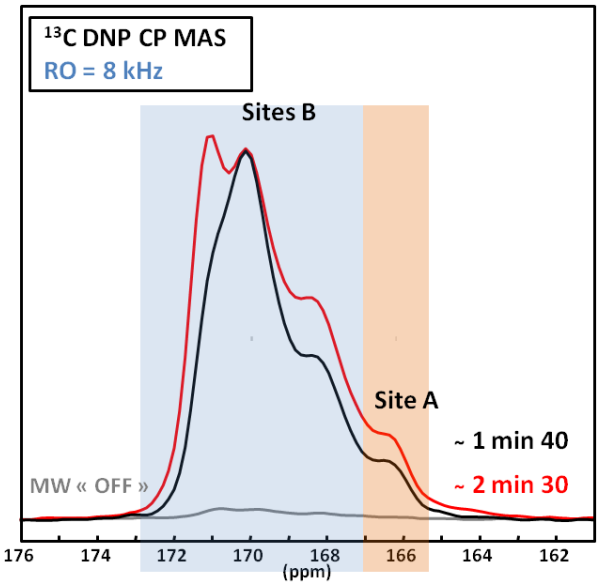



**Figure 3-21 : Spectres normalisés (ON) $^{13}$C DNP CP MAS de l'échantillon CHAp, enrichi en $^{13}$C : $^{1}$H → $^{13}$C CP (en rouge) et $^{1}$H → $^{31}$P → $^{13}$C double CP (en noir). MW OFF : absence d'irradiation microonde. Pour CP d1 = 8,5 s et NS = 16. Pour double CP d1 = 6,5 s et NS = 16.**

La Figure 3-21 présente les spectres $^{1}$H → $^{31}$P → $^{13}$C DNP CP/double CP MAS obtenus avec le biradical TOTApol. L'expérience de double polarisation croisée met en jeu deux temps de contact successifs : $^{1}$H → $^{31}$P ($\tau_{CP1}$ = 9 ms) puis $^{31}$P → $^{13}$C ($\tau_{CP2}$ = 20 ms). Les deux temps de contact ont été optimisés successivement. Notons ici un détail expérimental important : le premier contact est effectué à l'aide d'une rampe classique. Nous avons montré que pour optimiser la sensibilité de l'expérience, il était intéressant de mettre en œuvre une rampe "tangente" [61] durant le second contact entre hétéronoyaux $^{31}$P et $^{13}$C. De plus, le réglage des puissances RF sur les différents canaux doit être particulièrement précis, de façon à optimiser au mieux les deux conditions de Hartmann-Hahn successives (des pas de 0,1 W ont été utilisés – ceci peut paraître curieux sachant que des rampes sont utilisées durant les deux transferts et que la fréquence de rotation MAS (8 kHz) est modérée ; c'est ce que nous avons observé expérimentalement). Globalement, l'intensité des signaux $^{13}$C obtenue après double polarisation croisée est légèrement inférieure à celle obtenue après simple transfert CP. Le rapport signal/bruit de l'expérience reste néanmoins excellent (voir Figure 3-21). Les spectres ont été normalisés afin d'être plus facilement comparés. On note que le second temps de contact est relativement long ($\tau_{CP2}$ = 20 ms) du fait de la faible valeur des couplages dipolaires hétéronucléaires $^{31}$P–$^{13}$C ($d_{^{31}P-^{13}C}$ ≤ 300 Hz pour 3,4 Å ≤ d($^{31}$P–$^{13}$C). Une telle distance est justifiée ci-dessous. Un temps de contact (long) permet de sonder une assez grande gamme de distances internucléaires. L'expérience de double CP est caractérisée par une résolution tout à fait comparable à celle de l'expérience de simple CP, mais on observe des différences nettes au niveau des *intensités relatives*. Ces expériences de triples résonances ont été réalisées sur le même échantillon de CHAp en utilisant le biradical AMUpol. Les deux séries d'expériences sont identiques, à l'exception d'un gain DNP beaucoup plus important dans le cas de l'AMUpol, comme attendu.

Pour tenter d'interpréter ces observations expérimentales, nous nous appuyons sur des modèles théoriques d'hydroxyapatite carbonatée obtenus par minimisation d'énergie [62], [52]. De Leeuw *et coll*. utilisent des méthodes de simulation fondées sur le modèle de Born des solides (utilisation de potentiels interatomiques prenant en compte les forces de répulsion et de van der Waals entre nuages électroniques et des fonctions analytiques paramétrisées simples). Les potentiels

interatomiques ont été déterminés empiriquement et adaptés à la famille des matériaux apatitiques. L'approche calculatoire est aux bords périodiques. Des supermailles suffisamment volumineuses ont été prises en compte de façon à limiter les effets de bords et les interactions entre images. Ces supermailles, obtenues à partir de la maille monoclinique de l'hydroxyapatite, sont caractérisées par le groupe d'espace *P1* en fin d'optimisations. Différents environnements ont été proposés pour les ions carbonates : en site A; en site B proche d'un cation $Na^+$ noté B-Na par la suite; en site B proche d'un groupement $OH^-$ noté B-OH, et enfin en sites A/B (mettant en jeu deux anions carbonates). Cette dernière combinaison a été caractérisée par FTIR et DRX sur poudre [63]].

Dans le cas de la substitution en site A, l'anion carbonate remplace deux groupements hydroxyles adjacents d'une même colonne parallèle à l'axe *c* de la structure et se situe approximativement à distance égale des deux lacunes. Néanmoins, le fait de se rapprocher du centre de la lacune ne s'accompagne pas d'une pénalité forte en énergie. Deux atomes d'oxygène sont quasiment situés le long de l'axe *c*. Les ions carbonates sont en liaisons–H avec les ions $OH^-$ : $O_2CO\cdots HO$ = 2,75 Å. Dans le cas d'une substitution en site B, on considère deux types de compensation de charge : ***(i)*** un groupement phosphate est substitué par un carbonate et un hydroxyle (site B-OH), ***(ii)*** un phosphate et un cation calcium sont substitués par un carbonate et un cation sodium (site B-Na). Dans le cas du site B-OH, l'ensemble "$CO_3^{2-}/OH^-$" est décalé par rapport à la position initiale du groupement phosphate. Deux des atomes d'oxygène de l'ion carbonate sont en liaisons–H avec $OH^-$ (2,15 à 2,41 Å). Le fait d'éloigner $CO_3^{2-}$ et $OH^-$ conduit à une déstabilisation de la structure. Il en est de même pour la substitution "$CO_3^{2-}/Na^+$" (B-Na). Enfin, dans le cas d'une substitution "mixte" A/B, la situation la plus favorable énergétiquement correspond à une association des deux sites A et B, les deux carbonates étant alors séparés par une distance de 4,04 Å. D'un point de vue expérimental, l'analyse très détaillée des spectres FTIR des CHAp sodées tend à démontrer que les carbonates et les ions sodium s'associent pour donner ce que Fleet nomme des « *defect clusters »* dans le réseau des apatites carbonatées [37]. Soulignons qu'il s'agit ici de clusters à trois entités (deux carbonates et un ion $Na^+$) mais que ni la spectroscopie FTIR, ni la diffraction des rayons X sur poudre ne peuvent donner des indications sur une agrégation (« clustering ») de tels groupes de défauts.

Un point très important à noter à ce stade est que, dans l'approche de De Leeuw *et coll.* [52], les sites considérés sont isolés dans les supermailles. Ainsi, les configurations A-A, B-(OH,Na)-B, A/B-B… ne sont pas prises en compte.

Revenons à notre interprétation des spectres de la Figure 3-21. D'après De Leeuw *et coll*. [52], un carbonate en site A est entouré de 6 voisins phosphates situés à des distances variant de 3,89 à 4,09 Å. En revanche, tous les carbonates en sites B sont caractérisés par la présence de 2 ou 3 voisins phosphates (au plus !), à des distances de $\sim$ 3,8 à $\sim$ 4,1 Å. Il en est de même de la substitution en site mixte A/B (ce qui différencie très nettement cette situation de la substitution en site A simple). De ces considérations structurales, il résulte que les sites A simples devraient être surestimés dans l'expérience $^1H \rightarrow {}^{31}P \rightarrow {}^{13}C$ DNP double CP MAS, de par la présence du filtre $^{31}P$. Ce n'est manifestement pas le cas. Cette observation tendrait à prouver que les sites A ne sont pas isolés mais plutôt en association de type A/B (voire A/A). Dans ce cas, l'environnement phosphaté des sites A dans la combinaison A/B est comparable à celui des sites B (*i.e*. 2 ou 3 voisins phosphates au plus).

Une autre observation peut être faite à partir de la Figure 3-21, à savoir la surestimation de la résonance des sites B centrée sur $\delta_{iso}(^{13}C) \sim 170{,}6$ ppm. Une hypothèse plausible est la suivante : ces sites sont relativement isolés dans la structure, entourés donc par 2 ou 3 voisins phosphates (d'où un transfert CP $^{31}P \rightarrow {}^{13}C$ efficace). Les autres sites de type B sont sous-estimés du fait d'un phénomène de clusterisation, ce qui conduit à une diminution globale du nombre moyen de voisins phosphates et donc de l'efficacité du processus CP, $^{31}P \rightarrow {}^{13}C$. Bien sûr, il ne s'agit ici que d'une hypothèse. L'étude des connectivités spatiales $^{13}C$–$^{13}C$ pourrait apporter des réponses très pertinentes : nous reviendrons sur ce point par suite.

■ Compte-tenu du temps d'acquisition très court des spectres 1D triple résonances (Figure 3-21), il a été possible d'étendre la séquence à sa version bidimensionnelle (double CP HETCOR). Le premier temps de contact, $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$ et $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$, a été optimisé. Le second temps de contact a été choisi volontairement assez long (20 ms) Les résultats obtenus, présentés sur la Figure 3-22, sont remarquables en ce qui concerne le temps d'acquisition (quelques heures) et le rapport signal/bruit qui est excellent (aucune apodisation du signal n'a été utilisée ici). Nous avons testé successivement la détection $^{13}C$ et la détection $^{31}P$. Les informations fournies par les deux cartes sont cohérentes entre elles et assez équivalentes. Globalement, une carte peut être obtenue à partir de la seconde par une rotation de 90° et un renversement plan. Notons que de telles expériences ont été tentées (pour comparaison) à température ambiante sans effet DNP (rotor *plein* de 3,2 mm). Malgré l'utilisation d'un champ magnétique beaucoup plus élevé (700 MHz), 1 à 2 jours d'acquisition ont été nécessaires pour obtenir un rapport signal/bruit comparable. Comme attendu, le pic situé à $\delta_{iso}(^{13}C) \sim 170{,}6$ ppm se singularise. Il présente deux corrélations : l'une avec les phosphates apatitiques « classiques » ($\sim 3{,}3$ ppm) ; l'autre avec une composante déblindée ($\sim 5{,}6$ ppm). On notera que l'expérience est particulièrement résolue : ainsi, à gauche de la Figure 3-22, on observe que les corrélations $^{31}P$ majoritaires, pour chaque résonance $^{13}C$, ne se situent pas exactement au même $\delta_{iso}(^{31}P)$ dans la dimension indirecte. La carte 2D avec détection $^{31}P$ (à droite de la Figure 3-22) semble présenter une résolution un peu plus faible sur la voie $^{13}C$. Il y a deux raisons à cela : ***(i)*** les résonances $^{13}C$ étant particulièrement résolues, il est plus difficile d'atteindre la résolution nécessaire sur la voie indirecte, ***(ii)*** la résonance à $\delta_{iso}(^{13}C) \sim 171{,}6$ ppm est surestimée par le premier transfert $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$. Cela conduit à une corrélation très intense qui peut masquer d'autres corrélations de plus faibles intensités.

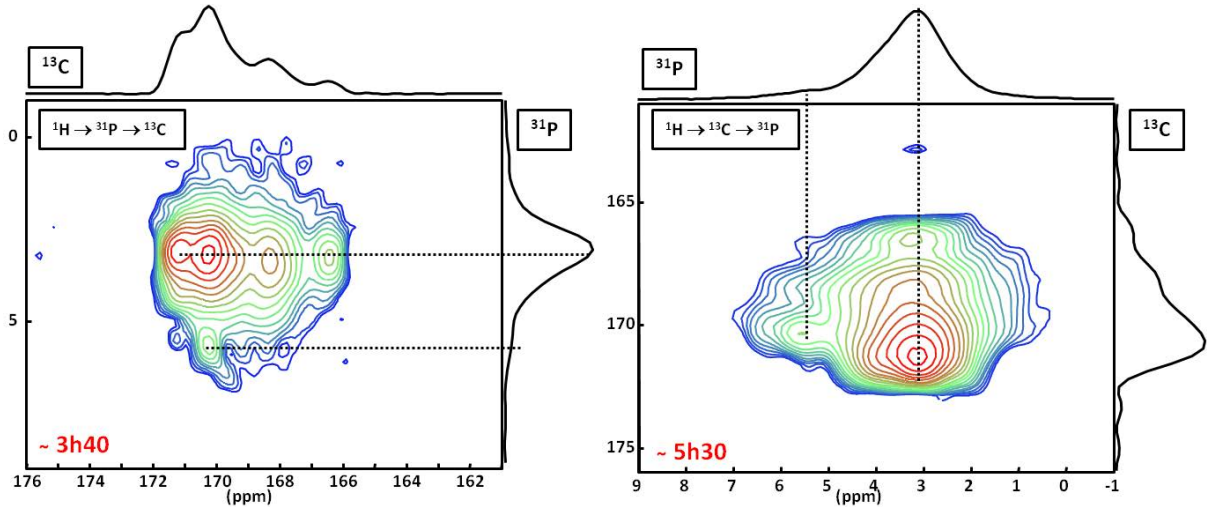



**Figure 3-22 : Spectres 2D HETCOR double CP : $^{1}$H → $^{31}$P → $^{13}$C et $^{1}$H → $^{13}$C → $^{31}$P de CHAp (enrichie en $^{13}$C). AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ (90/10).**

Précédemment, nous avons évoqué la possibilité de mettre en œuvre une séquence $^{13}$C–$^{13}$C fondée sur le recouplage dipolaire en rotation MAS. Cette approche nous permettrait de mettre en évidence *directement* les connectivités spatiales entre carbonates positionnés en sites A, B, A/B *etc.* Cette question est encore aujourd'hui largement débattue dans la littérature. A ce titre, il apparaît intéressant de se confronter à ce problème expérimental. Bien que nous considérions le composé CHAp *enrichi* en $^{13}$C comme composé test, le challenge spectroscopique apparaît important : quelle sera la *sensibilité* de l'expérience ? Quelle sera la *résolution* sur la voie double quanta $^{13}$C–$^{13}$C ?

■ Nous nous sommes orientés vers l'utilisation de l'expérience de recouplage dipolaire hétéronucléaire SPC5, initialement développée par Griffin *et coll.* [64]. L'optimisation de la séquence a été effectuée à l'aide du spectre 1D filtré par les cohérences double quanta. Les résultats sont présentés sur la Figure 3-23. Nous observons tout d'abord de nombreuses corrélations (!), en 7 heures d'acquisition. Afin d'estimer la résolution sur la voie indirecte nous présentons sur la Figure 3-23 un certain nombre de tranches, **a)** à **d)**. Afin d'accroître la résolution, nous avons utilisé un traitement mathématique de type GB. Les principales conclusions sont les suivantes : ***(i)*** en accord avec les résultats de spectroscopie FTIR et les calculs de dynamique moléculaire, les sites A sont impliqués dans une association de type A/B. Il est possible d'extraire la valeur $\delta_{iso}(^{13}C)_{B\ in\ A/B} \sim 168{,}0$ ppm. A notre connaissance, il s'agit de la première donnée de la littérature d'une telle précision en RMN $^{13}$C des apatites carbonatées, ***(ii)*** les associations de type A/A ne sont pas favorisées : en effet, nous n'observons pas de pic de corrélation *sur la diagonale* aux déplacements chimiques impliqués (tranche **a)**), ***(iii)*** des sites B, de déplacements chimiques isotropes très proches ($\delta_{iso}(^{13}C)_{B\ in\ B/B} \sim 168{,}5$ ppm), sont mis en évidences *via* une corrélation assez intense sur la diagonale (tranche **b)**), ***(iv)*** la tranche **c)** présente au moins 2 paires de corrélations (!) ce qui démontre la très bonne résolution de cette expérience (sites de type B), ***(v)*** enfin, les corrélations les plus intenses correspondent à deux carbonates en sites B, parfaitement définis par leurs déplacements chimiques $^{13}$C, ($\delta_{iso}(^{13}C) > 170$ ppm (tranche **d)**)).

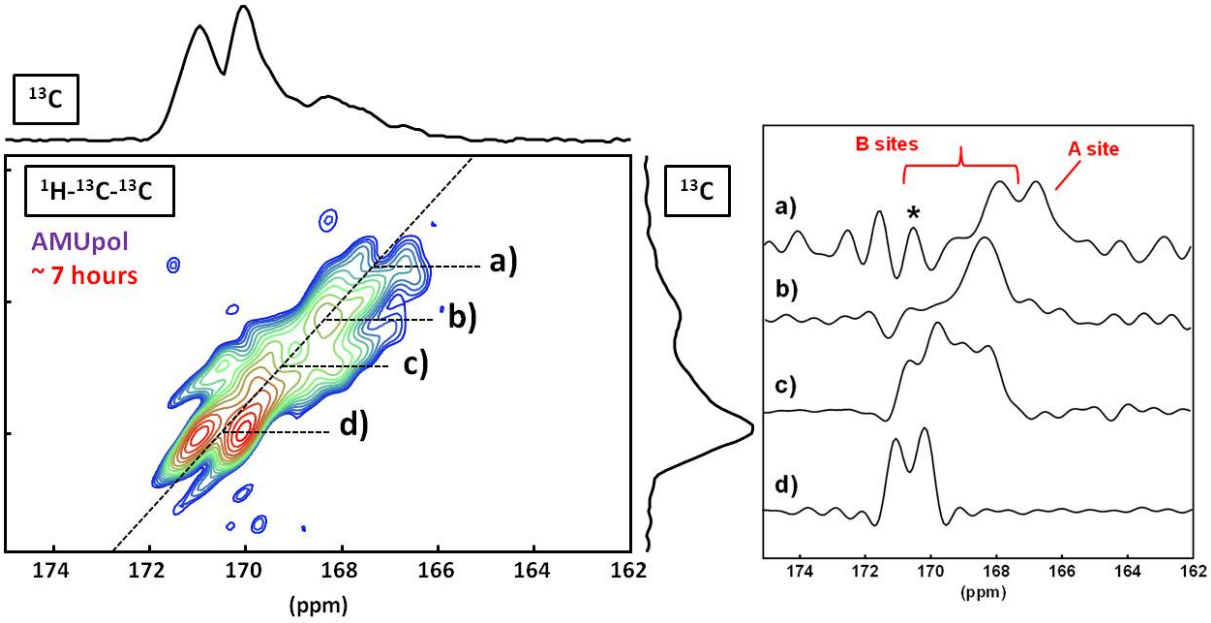



**Figure 3-23 : En haut : spectre 2D DNP SPC5 MAS (recouplage dipolaire homonucléaire) de CHAp, *enrichie* en $^{13}C$ : $^{1}H \rightarrow {}^{13}C \rightarrow {}^{13}C$. AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ (90/10). En bas : tranches $^{13}C$ extraites aux déplacements chimiques a), b), c) et d). Traitement du signal de type GB sur la voie indirecte. * ne pas tenir compte de ce signal, qui correspond à une oscillation induite par le traitement GB.**

En conclusion de ce paragraphe, nous mentionnons que cette expérience de recouplage dipolaire $^{13}C$–$^{13}C$ nous a permis de jeter un regard nouveau sur les substitutions de l'apatite de synthèse en sites A et/ou B. L'expérience proposée est d'une incroyable richesse … peut être trop, dans un sens. En effet, les effets sur le déplacement chimique $^{13}C$ sont de l'ordre de la fraction de ppm. Bien que l'expérience soit reliée à un échantillon "désordonné" par nature, au sens de la diffraction des rayons X, il semble qu'un "certain ordre" existe – à l'échelle locale de la RMN. Il en résulte une résolution spectrale élevée, qui est observée sur la carte bidimensionnelle. Nous pouvons peut-être aller encore plus loin dans les hypothèses structurales. De la Figure 3-23, nous déduisons que de nombreuses corrélations de type B/B existent ce qui tendrait à prouver la "clusterisation" des sites A et B au sein de CHAp. D'une certaine manière, il y aurait ségrégation des "défauts" carbonatés dans la structure. Bien entendu, nous devons garder en mémoire que les corrélations sont filtrées par les cohérences double quanta. Elles pourraient ne pas être représentatives de l'ensemble des nanoparticules de CHAp. Cependant, compte tenu de l'excellent rapport signal/bruit de l'expérience, nous faisons l'hypothèse que peu de sites A et/ou B sont effectivement isolés les uns des autres.

■ Nous rappelons que la synthèse de l'échantillon CHAP, *enrichi* en $^{13}C$, a été effectuée à partir de $Na^{13}\underline{C}HCO_3$ (voir Chapitre 1). Il est également connu dans la littérature que les ions $Na^+$ peuvent substituer partiellement les ions $Ca^{2+}$ de la structure apatitique [65]. Comme la fréquence de Larmor du $^{23}Na$ est très proche de celle du $^{13}C$ sur un spectromètre 400 MHz (105,8 MHz et 100,6 MHz, respectivement), il a été possible de mettre en œuvre des expériences $^{23}Na$ DNP CP MAS à la suite des expériences $^{13}C$ (la sonde DNP MAS étant accordable sur une gamme centrée autour de 100 MHz). Nous avons utilisé une fois encore CHAp pour optimiser l'expérience. Bien que le noyau $^{23}Na$ ait des caractéristiques RMN favorables (abondance naturelle : 100 %, $\gamma$ moyen, I = 3/2), un problème de sensibilité se pose néanmoins compte tenu de la très faible teneur en sodium de l'échantillon : 1,23 wt%. Dans un second temps, nous avons tenté de synthétiser une apatite sodée riche en sodium, en milieu hydrothermal (la source de sodium étant ici NaCl - voir Chapitre 1). Nous

noterons cet échantillon $NaHAp_{hydrotherm}$ par la suite. Notre idée est ici d'utiliser l'expérience $^{23}Na$ DNP CP MAS à des fins d'*édition spectrale* (ions $Na^+$ situés au cœur, et à l'extérieur de la structure apatitique).

Le spectre 1D $^{23}Na$ DNP CP MAS de CHAP (enrichie en $^{13}C$), en présence d'AMUpol, est présenté sur la Figure 3-24. L'effet DNP est manifeste ($\varepsilon(^{23}Na)_{ON/OFF} \sim 40$ – cette valeur est tout à fait comparable à celle obtenue pour $^{1}H$, $^{13}C$ et $^{31}P$, voir ci-dessus). Nous n'avons pas rencontré de problème particulier quant au comportement de l'aimantation $^{23}Na$ durant le spin lock (à 100 K), alors que cela peut être un réel problème à température ambiante.

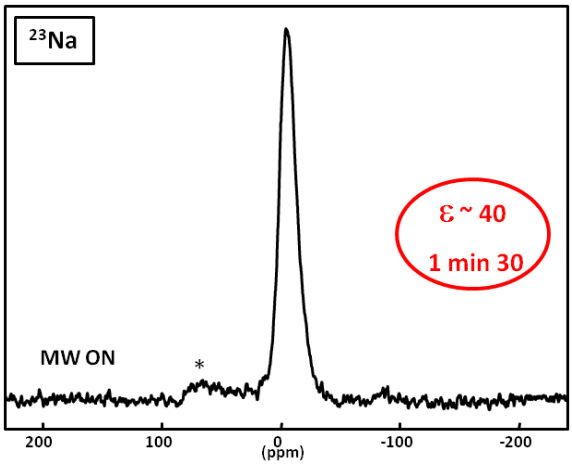



**Figure 3-24 : Spectre $^{1}H \rightarrow {}^{23}Na$ DNP CP MAS de CHAp, *enrichie* en $^{13}C$, et sodée (1,23 wt%) (précurseur : $NaH^{13}CO_3$), AMUpol/$D_2O$/$H_2O$. RO = 8 kHz. NS = 16, $\tau_{CP}$ = 6 ms, délai de relaxation $^{1}H$ : 15 s. La bande de rotation est indiquée par *.**

L'extension à une expérience 2D HETCOR est aisée (Figure 3-25). Les cartes obtenues varient fortement en fonction du temps de contact choisi (ici $\tau_{CP}$ = 0,25 et 6,0 ms). A court temps de contact, une forte corrélation est mise en évidence entre les noyaux $^{23}Na$ et les protons du solvant (~ 6,5 ppm). Il s'agit très certainement d'un transfert en surface des nanoparticules de CHAp. On remarque néanmoins une corrélation (nettement plus faible) impliquant les protons des groupements $OH^-$ appartenant aux colonnes parallèles à l'axe *c* de l'apatite (voir Figure 3-25). De manière très intéressante, l'augmentation notable de $\tau_{CP}$ (6,0 ms) ne conduit pas seulement à une augmentation du rapport signal/bruit (temps d'expérience réduit à 4 heures environ), mais également une inversion des intensités relatives des corrélations. Un poids beaucoup plus fort est donné à la corrélation impliquant les $OH^-$. Ceci est à relier à la diffusion de spin $^{1}H$–$^{1}H$ le long des colonnes qui tend à hyperpolariser le cœur des nanoparticules. Nous rencontrerons un tel effet plus tard, lors de l'étude de CHAp par $^{43}Ca$ DNP CP MAS (voir paragraphe 3.d).). La sélectivité de surface de la DNP (*SENS*) prend ici toute sa signification.

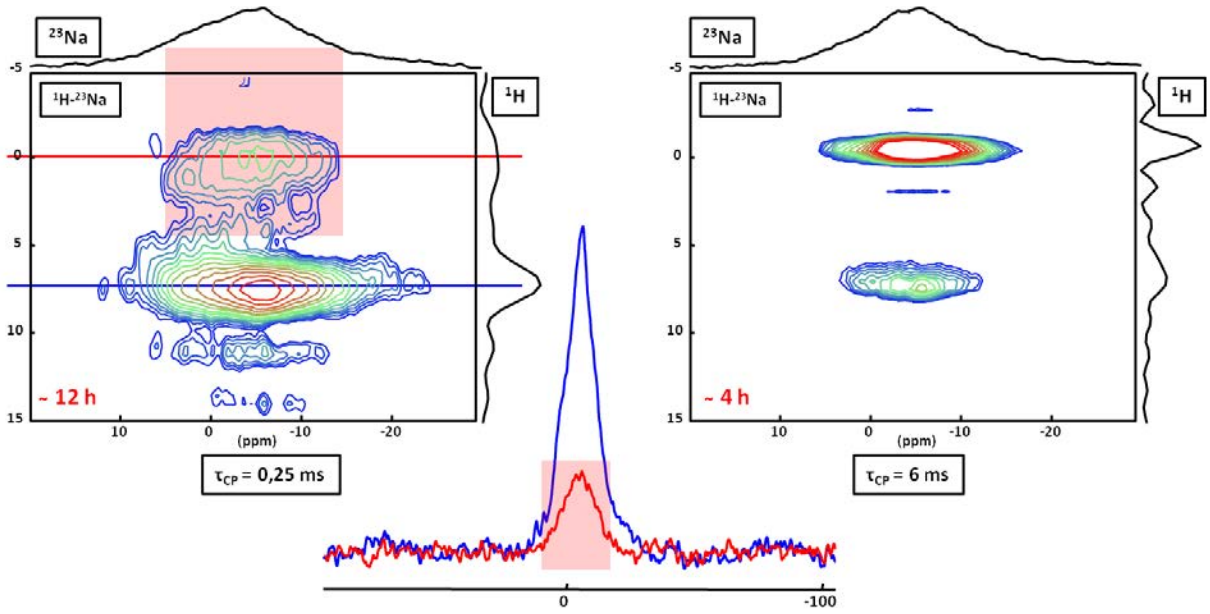



**Figure 3-25 : Spectres 2D $^{1}H \rightarrow {}^{23}Na$ DNP HETCOR CP MAS de CHAp, enrichie en $^{13}C$ et sodée (1,23 wt%) (AMUpol/$D_2O$/$H_2O$) à deux temps de contacts différents : $\tau_{CP}$ = 0,25 and 6,0 ms. Les corrélations concernent les protons du solvant (~ 6,5 ppm) et les groupements $OH^-$ (0,0 ppm) des colonnes de l'apatite, parallèles à l'axe *c*. La figure du bas montre les deux tranches extraites du spectre HETCOR 2D à $\tau_{CP}$ = 0,25 ms (rouge à 0 ppm et bleu à 6,5 ppm).**

La superposition des deux tranches à 0 et 6 ppm (Figure 3-25) de la carte 2D HETCOR $^{1}H \rightarrow {}^{23}Na$ DNP CP MAS ($\tau_{CP}$ = 0,25 ms) montre un signal plus large en pieds de pic pour la corrélation des protons de surface (6 ppm) surement dû à une distribution des sites $Na^+$ en surface.

Les spectres $^{23}$Na DNP CP MAS de $NaHAp_{hydrotherm}$ sont présentés sur la Figure 3-26. Le spectre $^{1}H \rightarrow {}^{23}Na$ DNP CP MAS est présenté sur la Figure 3-26a. Il est très comparable à celui de CHAp sodée (voir Figure 3-24). Le spectre $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$ DNP CP MAS est présenté sur la Figure 3-26b. On observe une résonance $^{31}$P (majoritaire) beaucoup plus fine que dans le cas de CHAp. L'expérience HETCOR bidimensionnelle permet d'éditer le spectre $^{31}$P *via* l'interaction dipolaire hétéronucléaire $^{31}P–{}^{23}Na$ (Figure 3-26c). D'un point de vue expérimental, les réglages du double transfert CP ont été optimisés de manière très rigoureuse ; le succès de l'expérience en dépend : utilisation de rampes tangentes [61], réglages des puissances sur les canaux $^{31}$P et $^{23}$Na à l'aide de pas de 0,1 W. Malgré l'utilisation de rampes et une fréquence de rotation MAS modérée (ici 8 kHz), les conditions de Hartmann-Hahn sont particulièrement sensibles à tout écart de puissance.

La projection sur la voie $^{31}$P, bien qu'assez résolue, ne correspond absolument pas à une résonance fine. En d'autres termes, une composante apatitique *non sodée* est surestimée sur le spectre bleu de la Figure 3-26b. Les résonances $^{31}$P associées aux phosphates en interaction dipolaire avec les ions $Na^+$ correspondent uniquement aux pieds de pic (spectre double CP rouge). En conclusion : ***(i)*** l'expérience $^{1}H \rightarrow {}^{23}Na \rightarrow {}^{31}P$ DNP CP MAS permet d'envisager une édition spectrale très efficace des spectres $^{31}$P dans le cas des apatites sodées, ***(ii)*** la résolution sur la voie $^{31}$P est élevée, ce qui prouve que nous ne sommes pas en face d'un désordre total, au sens de la RMN, ***(iii)*** enfin, la synthèse de $NaHAp_{hydrotherm}$ par voie hydrothermale n'a pas été concluante !… En effet, l'apatite obtenue majoritairement n'est manifestement pas sodée. Seule une fraction restreinte l'est.

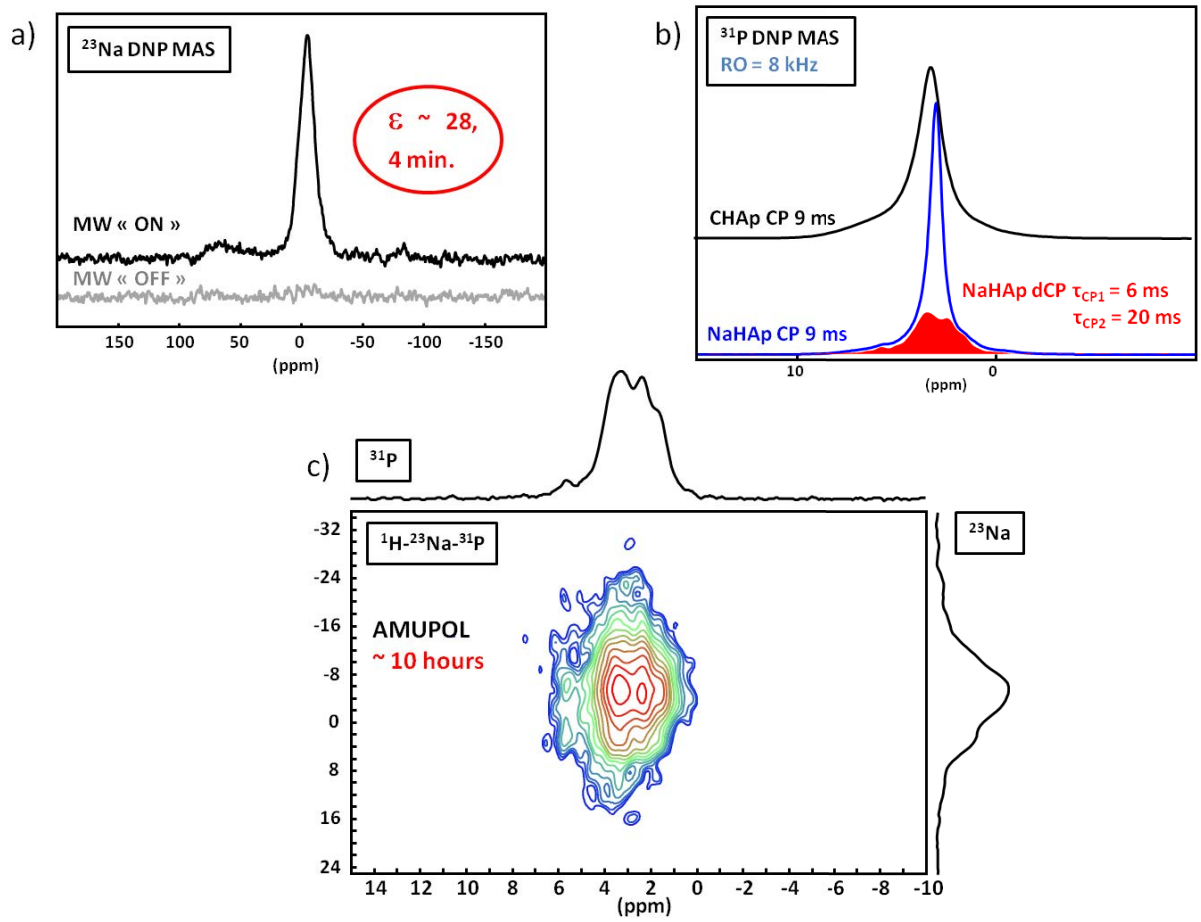



**Figure 3-26 : Spectres $^{31}$P et $^{23}$Na DNP CP MAS de $NaHAp_{hydrotherm}$. a) spectre 1D $^{1}$H → $^{23}$Na DNP CP MAS : $\tau_{CP}$ = 6 ms. b) spectre 1D $^{1}$H → $^{23}$Na → $^{31}$P DNP CP MAS ($\tau_{CP1}$ = 6 ms et $\tau_{CP2}$ = 20 ms) en rouge et $^{1}$H → $^{31}$P DNP CP MAS ($\tau_{CP}$ = 9 ms) en bleu. Le spectre $^{1}$H → $^{31}$P de CHAp ($\tau_{CP}$ = 9 ms) est rappelé en noir. c) carte 2D $^{1}$H → $^{23}$Na → $^{31}$P DNP HETCOR CP MAS, ($\tau_{CP1}$ = 6 ms et $\tau_{CP2}$ = 20 ms) NS = 48 et 64 incréments $t_1$.**

En conclusion de cette section, nous avons tenté de mettre en place une séquence de corrélation $^{23}$Na–$^{23}$Na en utilisant SPC5, et de faibles puissances sur la voie $^{23}$Na (de façon à manipuler des spins ½ fictifs). L'expérience n'a pas été totalement convaincante mais mériterait d'être développée plus en avant dans le futur.

### c) Expériences 2D $^{13}$C DNP CP MAS double et triple résonances en *abondance naturelle*

L'extension de l'approche DNP à des composés d'origine naturelle passe nécessairement par sa validation dans le cas de noyaux présents en *abondance naturelle* : nous pensons ici en particulier au carbone-13. Nous avons testé la méthodologie DNP décrite ci-dessus à l'aide d'un échantillon *non enrichi* en $^{13}$C de CHAp. Le protocole expérimental est celui utilisé dans le cas de CHAp *enrichie* en $^{13}$C (voir section 3.a).). Les résultats obtenus sont résumés sur la Figure 3-27. La Figure 3-27a démontre sans aucune ambiguïté que l'approche DNP est transposable à l'étude des apatites substituées en *abondance naturelle* : après 16 minutes (!) d'acquisition, le spectre obtenu présente un rapport signal/bruit tout à fait convenable. A titre de comparaison, en RMN standard à 700 MHz et en utilisant un rotor plein de diamètre 3,2 mm, environ 20 heures d'accumulation sont nécessaires pour obtenir un rapport signal/bruit comparable. De tels spectres $^{13}$C obtenus en 16 minutes permettent d'envisager sans problème des expériences de type 2D HETCOR (voir

Figure 3-27b). Un découplage homonucléaire $^{1}H$–$^{1}H$ de type FSLG (*Frequency Switched Lee Goldburg*) [9], [10] a été utilisé systématiquement de façon à améliorer la résolution $^{1}H$ sur la voie indirecte. Pour $\tau_{CP}$ = 3 ms, des corrélations entre les $^{13}C$ des carbonates et les protons du solvant et des hydroxyles sont mises en évidence. A plus faible temps de contact (Figure 3-27c), il est même possible d'avoir des informations supplémentaires concernant certaines corrélations particulières de surface. On note en particulier la surestimation d'un pic situé à $\delta_{iso}(^{13}C) \approx 171$ ppm, en corrélation avec des protons du solvant à $\delta_{iso}(^{1}H) \sim 6{,}5$ ppm. Enfin, Figure 3-27d il a été possible d'enregistrer sans problème particulier une expérience 2D $^{1}H \rightarrow {}^{31}P \rightarrow {}^{13}C$ HETCOR tout à fait comparable à celle présentée précédemment (voir section 3.b).).

Bien sûr, nous avons tenté de mettre en œuvre l'expérience de corrélation homonucléaire $^{13}C$–$^{13}C$ (SPC5) dans le cas de CHAp, non enrichie en $^{13}C$. L'idée était tentante du fait : ***(i)*** du succès de cette famille d'expériences, en *abondance naturelle*, dans le cas de composés carbonés par De Paëpe *et coll*. [66], ***(ii)*** de la suppression intrinsèque (en abondance naturelle) de problèmes éventuels dus à la troncature dipolaire [66]. Les résultats de l'expérience SPC5 n'ont pas été concluants (malgré une tentative systématique d'optimisation des paramètres) : n'oublions pas que l'échantillon contient environ 1 % en masse en atomes de carbone, à 1,1 % en $^{13}C$… Nous pensons qu'en optimisant la création de cohérence double quanta $^{13}C$–$^{13}C$ il sera possible de rendre opérante une telle approche.

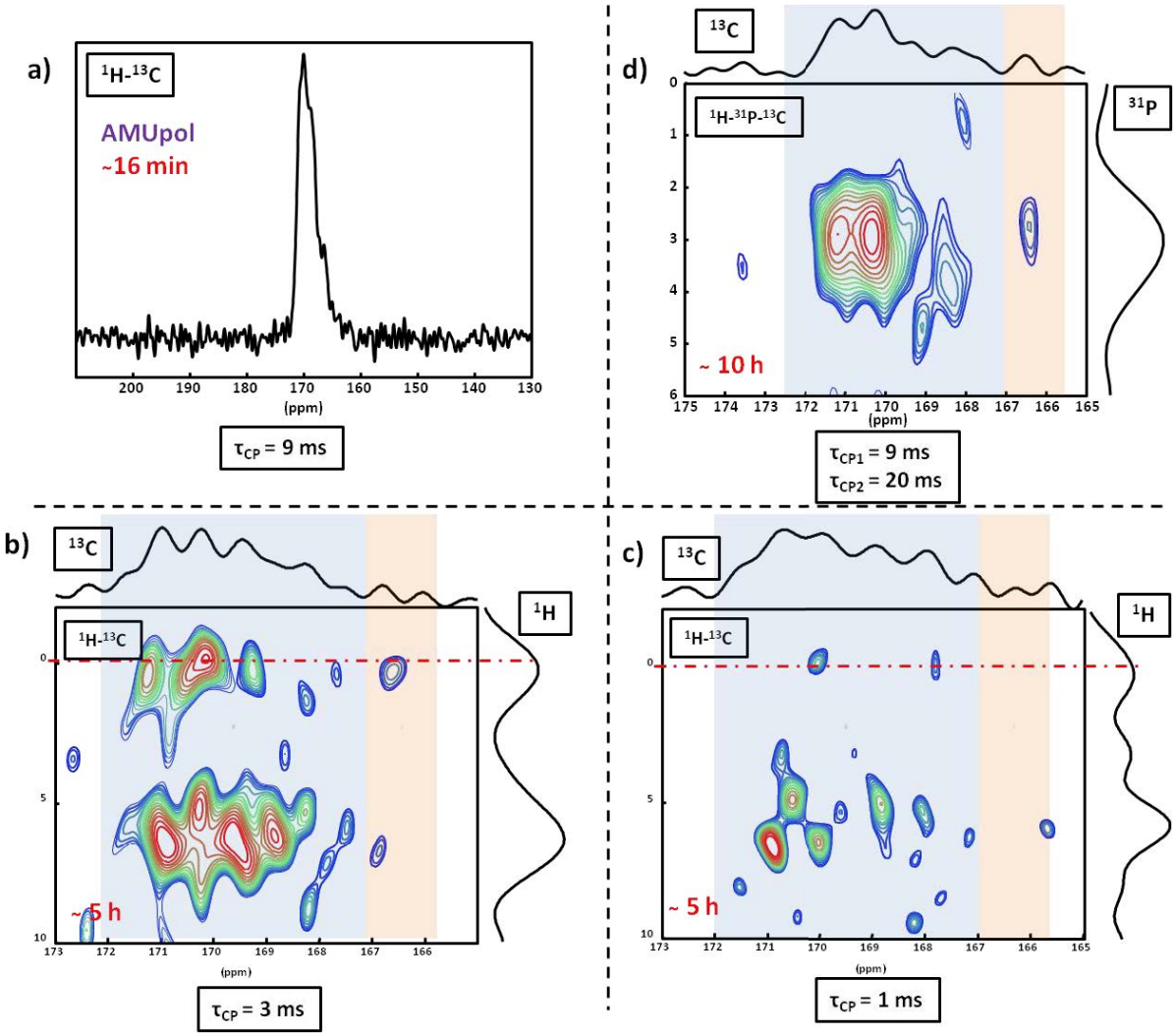



**Figure 3-27 : Spectres $^{1}$H → $^{13}$C DNP CP MAS de CHAp *non enrichie* en $^{13}$C (AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ (90/10). a) spectre 1D $^{13}$C DNP CP MAS obtenu pour $\tau_{CP}$ = 9 ms. Le spectre est obtenu en 16 minutes environ. b) Carte 2D $^{1}$H → $^{13}$C DNP HETCOR CP MAS obtenue en 5 heures environ ($\tau_{CP}$ = 3 ms). c) Carte 2D $^{1}$H → $^{13}$C DNP HETCOR CP MAS obtenue pour $\tau_{CP}$ = 1 ms. d) Carte 2D $^{1}$H → $^{31}$P → $^{13}$C DNP HETCOR CP MAS.**

### d) Expériences 2D $^{43}$Ca DNP CP MAS double et en *abondance naturelle*

Nous allons conclure cette section en présentant des expériences très récentes (avril/mai 2016). Les résultats sont en cours de publication. Il s'agit d'un travail collaboratif impliquant des collègues de Grenoble (G. De Paëpe et D. Lee) et de Montpellier (D. Laurencin). Nous présentons cette partie sous forme d' « article ». Afin de faciliter la lecture de cet article, nous résumons ci-dessous les points essentiels du travail effectué :

***(i)*** L'expérience $^{43}$Ca DNP CP MAS a été conduite avec succès à partir de l'échantillon CHAp, *non enrichi* en $^{13}$C.

A notre avis, il s'agit d'un résultat majeur de cette thèse, sachant que le $^{43}$Ca est un noyau très peu sensible du tableau périodique ($\gamma$ faible et abondance naturelle ~ 0,14 %) (Figures 1 et 3 de l'article).

***(ii)*** Dans ce cas particulier, l'ASR [59] a pu être estimé à ~ 35 soit un gain en temps d'expérience de l'ordre de ~ 1225.

***(iii)*** L'utilisation du glycérol-$d_8$ comme cryoprotecteur a permis d'obtenir des $\varepsilon$ de l'ordre de 100 (soit une amélioration d'un facteur ~ 5 par rapport à l'expérience DNP *sans* glycérol).

***(iv)*** Des cartes 2D $^{1}H \rightarrow {}^{43}Ca$ DNP HETCOR CP MAS ont été obtenues en … 4 heures (!), et ce à partir d'une masse d'échantillon de l'ordre de 20 mg (Figure 4b de l'article). Une telle expérience aurait duré ~ *205 jours* sans effet DNP.

***(v)*** Des corrélations impliquant les protons du solvant ($H_2O/D_2O$), du glycérol-$d_8$, et des hydroxyles ($OH^-$) de l'apatite sont mises en évidence *via* la variation de $\tau_{CP}$, le temps de contact du transfert CP.

***(vi)*** Le spin lock du noyau $^{43}Ca$ durant le transfert CP ne pose aucun problème, alors qu'il est très difficile à réaliser à température ambiante [54].

***(vii)*** Des expériences $^{1}H \rightarrow {}^{31}P \rightarrow {}^{43}Ca$ peuvent être envisagées sans difficulté particulière (*a priori*). Un enrichissement faible, voire très faible en $^{43}Ca$ (quelques %), devrait ouvrir la voie à des expériences $^{1}H \rightarrow {}^{43}Ca \rightarrow {}^{13}C$.

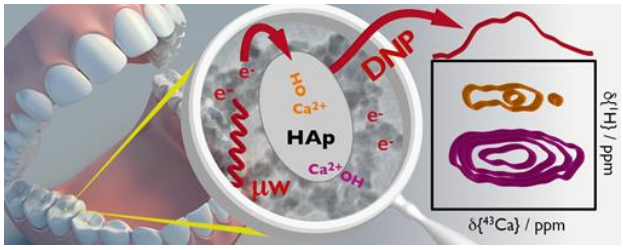
***(viii)*** Nous pensons que ce type d'expérience pourra être appliqué avec succès à des matériaux synthétiques à base de calcium (apatites biomimétiques, ciments…), ainsi qu'à des matériaux naturels (os, dents, calcifications pathologiques…).

# Insights into interfacial $Ca^{2+}$ in hydroxyapatite nanoparticles: MAS-DNP enables fast natural isotopic abundance $^{43}Ca$ NMR spectroscopy

*Daniel Lee[1,2], César Leroy[3], Charlène Crevant[3], Laure Bonhomme-Coury[3], Florence Babonneau[3], Danielle Laurencin[4], Christian Bonhomme[3], Gaël De Paëpe*[1,2]*

[1] Univ. Grenoble Alpes, INAC, F-38000 Grenoble, France. [2] CEA, INAC, F-38000 Grenoble, France. [3] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Collège de France, UMR CNRS 7574, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, 4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France. [4] Institut Charles Gerhardt de Montpellier, UMR5253, CNRS UM ENSCM, CC1701, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France.

**KEYWORDS**: nano-hydroxyapatite • surface characterization • dynamic nuclear polarization • solid state nuclear magnetic resonance




The nanoscale interfaces within bones, teeth, shells, and other hybrid biomaterials are of paramount importance but remain particularly difficult to characterize at the molecular level because both *sensitive* and *selective* techniques are mandatory. In this contribution, it is demonstrated that unprecedented insights into calcium environments, for example the differentiation of "surface" and "core" species of biomimetic carbonated hydroxyapatite nanoparticles, can be obtained both *sensitively* and *selectively* using solid-state NMR, when combined with magic angle spinning and dynamic nuclear polarization (MAS-DNP). Though $^{43}$Ca represents an ideal NMR target here (and *de facto* for a large variety of calcium-derived materials), it corresponds to one of the most insensitive nuclei. Using the sensitivity gains resulting from MAS-DNP, not only could $^{43}$Ca NMR spectra be obtained easily, but for the first time natural isotopic abundance 2D $^{1}$H-$^{43}$Ca and $^{1}$H-$^{13}$C correlation experiments could be recorded in short experimental time thanks to the 3 orders of magnitude of time saving. This opens exciting new perspectives not only for the detailed study of interfaces in nanostructured materials of the highest biological interest, but also for calcium-based nanosystems in general.

Calcium is an important element in many natural and synthetic materials. It is the 5$^{th}$ most abundant element in the Earth's crust, where it is found in minerals like calcite ($CaCO_3$) and gypsum ($CaSO_4.2H_2O$). Another key $Ca^{2+}$-containing material is apatite, a calcium phosphate which is naturally present in sedimentary rocks in the form of fluorinated francolite, as well as in bones and teeth of vertebrae in the form of carbonated hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). At the industrial level, Ca-silicates are among the main constituents of cement and concrete. The broad diversity of structural roles played by calcium compounds undoubtedly comes from the ability of $Ca^{2+}$ cations to adopt a large variety of coordination environments, with coordination numbers varying from 4 to 9, and many different coordination geometries. Thus, determining the local environment of calcium is of fundamental importance to fully understand the structure and properties of these materials. Unfortunately, very few techniques are available to probe the local structure around calcium atoms, especially in disordered or amorphous materials, or in materials with several different calcium environments. This is the case in organic-inorganic biomaterials like bone, where calcium is present not only in the mineral phase but also at the organic-mineral *interface*.

Here, the problem of observing these local calcium environments at their *natural isotopic abundance* and in the general frame of apatitic structures is tackled. This is achieved on nanosized synthetic carbonated hydroxyapatite (C–HAp) obtained by precipitation in aqueous medium. In a first rough approximation, these C–HAp nanoparticles (5.20 wt% in carbonates, 1.03 wt% in $Na^+$) can act as a structural analog for the inorganic component of bone tissues. Such nano-objects present intrinsic distributions of both cationic and anionic sites in the core as well as at the surface of the particles, leading to challenging analysis and interpretation.

Solid-state NMR has been used to study calcium environments[67]–[70] but only rarely due to severe sensitivity drawbacks. Indeed, the natural abundance of $^{43}$Ca, the NMR-active isotope of calcium, is only 0.14%. Moreover, it has a small gyromagnetic ratio ($|\gamma_{Ca\text{-}43}|/\gamma_{H\text{-}1} \sim 0.07$) and spin-7/2, rendering it a highly insensitive nucleus. Nevertheless, natural abundance experiments can be performed on large sample volumes (using 7 mm rotors or larger, limiting magic angle spinning (MAS) rates to ~ 5 kHz) in combination with the highest magnetic field available (14 T or higher) and signal-enhancing NMR pulse sequences.[24], [67], [70] Even in these favorable conditions, experimental times for recording 1D $^{43}$Ca MAS NMR spectra can reach ~ 7–10 hours. It follows

that attempting to gain further information from 2D experiments, recorded at *natural abundance*, remains unrealistic. In the case of $^{43}$Ca-*labeled* samples, very few $^{43}$Ca 2D and triple resonance experiments have been reported so far because commercial $^{43}$Ca-labeled calcite ($CaCO_3$) is a highly expensive starting chemical.[53], [67], [71]–[74]

Recently, high-field dynamic nuclear polarization combined with magic angle spinning (MAS-DNP)[75] has been shown to alleviate some of the difficulties when trying to observe these "low-gamma" nuclei.[76]–[78] This is because in MAS-DNP the large polarization of electron spins can be transferred to nuclei, greatly increasing their sensitivity in solid-state NMR experiments. Moreover, MAS-DNP experiments are generally performed with low sample temperatures of approximately 100 K, which has been shown to be beneficial not only for the efficiency of the DNP process but also for cross-polarization (CP) of quadrupolar[79] and low-gamma[76] nuclei. Recent work using MAS-DNP has also shown its potential for studies of $^{17}$O, a quadrupolar nucleus with low natural abundance.[80], [81] Nevertheless, fast $^{43}$Ca NMR at natural isotopic abundance still seemed a pipe dream owing to the intrinsic combination of NMR obstacles.

Herein, it is demonstrated that MAS-DNP can not only be used to facilitate the fast acquisition of $^{43}$Ca NMR spectra, it is shown that this can be done for samples at their natural isotopic abundance, even allowing the successful acquisition of 2D correlation experiments, which provide here the unambiguous discrimination of "core" and "surface" calcium sites.

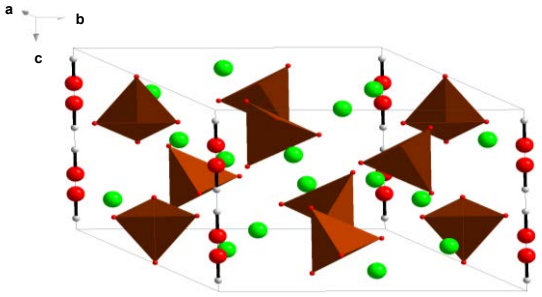


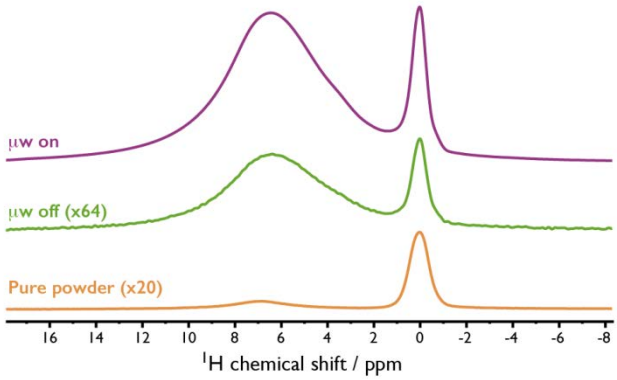

**Figure 1. Representation of the unit cell of *hexagonal* HAp, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Columns of $OH^-$ (A-sites) are represented vertically (*c*-axis) (Ca in green, O in red, H in white, $PO_4$ tetrahedra in brown). ICSD-26204: Hollysprings hydroxyapatite, showing the orientational disorder along the OH columns.**

## RESULTS AND DISCUSSION

The synthetic protocol to obtain the C-HAp nanoparticles is given in the Experimental Section and the routine characterization (TEM, XRD, FTIR, TGA) of the sample is presented in the Supporting Information. Figure 1 displays a schematic representation of stoichiometric HAp. Carbonate groups can partially substitute $OH^-$ (A-type) and/or $PO_4^{3-}$ moities (B-type).[37] The $OH^-$ groups form columns (parallel to the *c*-axis of the structure) that can be considered as rather "isolated" (the distance between two consecutive columns is ~0.9 nm) and can act as paths for quasi one-dimensional $^1$H–$^1$H spin diffusion. It is worth noting that Klimavicius *et al.* demonstrated very recently that moderate MAS rates (up to 9 kHz) had little impact on the spin-diffusion in nanostructured HAp.[50] Following the synthetic protocol, some $Ca^{2+}$ cations were substituted by $Na^+$ (see the chemical analysis in the Supporting Information).

To prepare the C-HAp for DNP experiments, approximately 30 mg of the white nanoparticulate (diameter ~ 30 nm, see Figure S1) powder was impregnated with a 30 µL aliquot of a glass-forming solvent matrix of glycerol-$d_8$/$D_2O$/$H_2O$ (60/30/10; v/v/v) containing 10 mM AMUPol[56] biradical polarizing agent. The slightly damp powder was packed into a 3.2 mm outer-diameter thin-wall zirconia MAS rotor and this was then inserted into the pre-cooled (100 K) MAS-DNP triple-resonance ($^1$H/$^{13}$C/$^{43}$Ca) NMR probe and pneumatically spun to the desired rate using cold nitrogen gas. Under these MAS conditions, a few watts of microwave (µw) irradiation at approximately the Larmor frequency of the unpaired electron spins of AMUPol (~263 GHz) are applied to the sample, inducing a transfer of the large spin polarization of the electrons to nearby

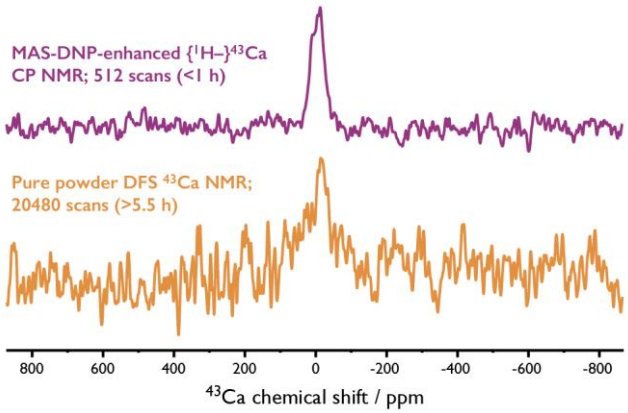
nuclei.[82], [83] For $^{1}$H nuclei, this is then equilibrated throughout the system via efficient $^{1}$H–$^{1}$H spin diffusion, resulting in a large net polarization gain among the $^{1}$H spins, as demonstrated in Figure 2. Comparison with the signal returned in the absence of μw irradiation and also with the signal for a full rotor of the pure powder only (i.e., no solvent matrix or polarizing agent), highlights the significant gain in signal intensity through the use of MAS-DNP. The absolute sensitivity ratio (ASR)[59] is the best method to compare gains with MAS-DNP to conventional MAS-NMR and gives a factor of ~35 here, corresponding to an experimental time saving of 3 orders of magnitude ($35^2$). The $OH^-$ groups are characterized by a sharp peak centered at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~0.0 ppm, whereas a broad deshielded component assigned to hydrogen-bonded water/glycerol molecules is observed at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~6.5 ppm (independent experiments, not shown here, have demonstrated that $HPO_4^{2-}$ entities were almost entirely absent in the C-HAp sample).




*(ix)*

**Figure 2. $^{1}$H Hahn-echo MAS NMR spectra of C–HAp, recorded at ~100 K and 9.4 T. The pure powder (bottom, orange, MAS rate = 8.5 kHz) and the impregnated sample with (top, purple) and without (middle, green) microwave irradiation suitable for DNP (both recorded using a MAS rate of ~14 kHz) are shown and scaled according to the numbers in parentheses.**

The $^{1}$H spectra of the impregnated sample in Figure 2 were obtained at a MAS rate of ~14.0 kHz. The sharpening of the $OH^-$ resonance compared to the spectrum recorded using a MAS rate of 8.5 kHz corroborates that $^{1}$H-$^{1}$H spin-diffusion is still efficient under these moderate MAS rates. The ratio of signal intensities measured in the presence and absence of μw irradiation, $^{1H}\varepsilon_{on/off}$, is 120 for water/glycerol and 110 for C-HAp $OH^-$ groups. Notably, these discrete but similar values can be measured since the $OH^-$ resonance remains clearly distinguished from the solvent contribution. Such a similarity tends to prove that almost all protons belonging to the C-HAp nanoparticles are involved in the DNP process. Interestingly though, after saturation, the monoexponential magnetization build-ups for $OH^-$ and the solvent (in the presence of biradicals) have time constants, $T_B(^{1}H)$, that are quite different: 5.0 and 3.0 s, respectively. It follows that both $^{1}$H spin baths can be considered as quite disconnected. However, connections *are* observed between the $OH^-$ and solvent resonances in a DNP-enhanced $^{1}$H–$^{1}$H spin-diffusion correlation experiment, albeit only at relatively long spin-diffusion mixing times (see Figure S5), indicating that the $^{1}$H spin baths are not totally disconnected. Hence, the hyperpolarization of $^{1}$H spins near to the polarizing agent can efficiently propagate from the solvent matrix into the nanoparticles via the $OH^-$ channels (which are not large enough to accommodate the AMUPol molecules).




*(x)*

**Figure 3. $^{43}$Ca MAS NMR spectra of C–HAp, recorded at ~100 K, 9.4 T, and using a MAS rate of 8.5 kHz. Direct CT excitation of $^{43}$Ca after DFS of the pure powder (bottom, orange) is compared to the DNP-enhanced {$^{1}$H–}$^{43}$Ca CP experiment (top, purple), recorded using a CP contact time of 5 ms. Note that the time required to obtain much greater S/N with the DNP-enhanced experiment was < 1/5 compared to the conventional method.**

Many sensitivity enhancing experiments for solid-state NMR of quadrupolar nuclei have been devised[84] and one of the most efficient involving population transfer, besides DNP, is a so-called double-frequency sweep (DFS)[85] that can result in an increase of the population difference across the central transition (CT) by saturating the satellite transitions under MAS, giving NMR signal increases for the more readily observed CT of spin-7/2 nuclei of around a factor of 4 (for full satellite transition inversions a factor of 7 is attainable, at least theoretically).[74] Figure 3 shows the $^{43}$Ca MAS NMR CT spectrum of C-HAp, recorded on the pure powder, after DFS, at a sample temperature of 100 K. Already by only using the low temperatures, the NMR signal-to-noise ratio (S/N) will be ~ 3.6 times greater compared to conventional room temperature measurements[86] as a result of the increased thermal nuclear polarization and decreased Johnson-Nyquist noise in the radio-frequency circuit of the NMR probe. This, combined with the DFS, will result in experiments requiring only one two-hundredth of the conventional acquisition time (time saving = $(3.6 \times 4)^2$). Nevertheless, even with the low temperatures and the DFS, the aforementioned difficulties of $^{43}$Ca NMR cannot be surmounted and the S/N from the natural isotopic abundance sample is poor, even after 5.5 h of signal averaging. The long experimental times required to obtain sufficient S/N then render the acquisition of more complex experiments (such as 2D schemes) completely infeasible.

Figure 3 also shows the DNP-enhanced $^{43}$Ca MAS NMR spectrum of C–HAp, recorded using a $^{1}$H–$^{43}$Ca CP step. It is evident that the S/N is significantly better compared to the spectrum of the pure powder recorded with DFS, even with the much reduced experimental time (< 1 h). It is worth highlighting that no data was recorded for the same experiment but in the absence of μw irradiation since this would have required months to obtain even a small signal. Therefore, the inefficiency of $^{1}$H–$^{43}$Ca CP is completely negated by the large sensitivity enhancement from the MAS-DNP at low temperature, allowing fast acquisition of $^{43}$Ca NMR spectra at natural isotopic abundance.

There are two non-equivalent calcium sites, Ca(I) and Ca(II) (hexagonal symmetry, Ca(II)/ Ca(I) = 1.5), present in the structure of stoichiometric HAp (the simulated spectrum based on previously published data[54], [67] is shown in Figure S6), with the Ca(II) sites being closer than Ca(I) sites to $OH^-$ groups. The experimental spectrum is comparable with the simulated one, though slightly broadened. Such broadening has already been described experimentally at moderate field (8.45 T) and is assigned to distributions of the quadrupolar parameters.[54], [67] At moderate fields, such distributions can play a significant role, especially in the case of nanoparticles for which surface and sub-surface defects are necessarily present in relatively high proportions. Furthermore, the substitution of some $OH^-/PO_4^{3-}$ groups by carbonates and some $Ca^{2+}$ by $Na^+$ (see the chemical analysis in the Supporting Information) can contribute as another source of local disorder and thus

also result in distributions of quadrupolar parameters and associated spectral broadening. Indeed, such broadening due to extended substitutions has been observed in natural samples such as teeth and bones.[65] It should also be noted that using CP can result in distorted quadrupolar lineshapes.[87]

As 1D DNP-enhanced {$^{1}$H–}$^{43}$Ca {CP}MAS NMR spectra could be recorded in a short experimental time, this experiment was easily extended to its 2D heteronuclear correlation (HETCOR) version,[88] which is used to probe proximities between the heteronuclei. A $^{1}$H–$^{43}$Ca HETCOR spectrum of C-HAp is presented in Figure 4b. To the best of our knowledge, this is the first ever obtained *without any $^{43}$Ca labeling*. Moreover, this was achieved with only a limited mass of sample (~ 30 mg). Most interestingly, two correlation peaks are clearly distinguished using a short CP contact time of 3 ms (in contrast with experiments at longer contact times of 7 ms, in which only the one correlation peak at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~ 0.0 ppm is present – see Figure S7). As expected, $^{43}$Ca sites are correlated to the columnar $OH^-$ groups at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~ 0.0 ppm. A strong correlation is also evidenced at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~ 3.0 ppm, although a $^{1}$H resonance related to this chemical shift can only be observed as a shoulder in Figure 2. The global linewidth of the $^{1}$H projection centered at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~ 3.0 ppm is estimated to ~ 2.7 ppm (from 1.7 to 4.4 ppm). Such a range of $^{1}$H chemical shifts is compatible with those of hydrogen-bonded hydroxyls,[89] indicating an assignment to surface $OH^-$ groups that are hydrogen-bonded to surface-bound water or surface-adsorbed solvent molecules. Contributions from pure solvent protons can be ruled out because these are much more deshielded, at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~ 6.5 ppm as shown in Figure 2. This is corroborated by the $^{1}$H–$^{13}$C HETCOR spectrum of C-HAp, which shows correlations for the $^{13}$C resonances only with $^{1}$H species with $\delta_{iso}(^{1}H)$ = 6.3 ppm (FWHM ~ 3 ppm) (see Figure S7a). Since the DNP solvent mixture (glycerol-$d_8$/$D_2O$/$H_2O$ (60/30/10; v/v/v)) was prepared at room temperature there will most likely be deuterium/proton equilibration of the exchangeable groups, leading to $(OH)_{water}$ / $(OH)_{glycerol}$ = 1.8, with both of these proton environments then contributing to this correlation at $\delta_{iso}(^{1}H)$ = 6.3 ppm. Furthermore, it should be noted that polyols such as glycerol (and carbohydrates as well) can chelate $Ca^{2+}$ cations.[90]–[93] So it cannot be ruled out that there is a $^{1}$H–$^{43}$Ca dipolar interaction between residual (non-hydrogen-bonded) glycerol molecules from the DNP solvent that are chelated to surface $Ca^{2+}$ sites, leading to a correlation at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~ 3.0 ppm. Therefore, it follows that this correlation is then fully attributable to $^{1}$H nuclei at the *surface* (i.e., not in the columnar channels) of the C-HAp nanoparticles, either from $OH^-$ groups or chelating glycerol molecules, that are coupled to surface or near-surface $Ca^{2+}$ cations.

At longer $^{1}$H–$^{43}$Ca CP contact times spin decoherence effects will become more important, reducing the efficiency of CP for local spin systems with larger $^{1}$H-$^{1}$H dipolar couplings and those that are in closer proximity to the electron spins from the polarizing agent. Hence, CP for the "isolated" $OH^-$ groups of the columns (*vide supra*) should be less affected than for the surface $OH^-$ groups (or solvent molecules), which is indeed the case here (see the $^{1}$H–$^{43}$Ca HETCOR spectrum of Figure S7b where a CP contact time of 7 ms was used, showing only a dominant correlation peak at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~ 0.0 ppm). The correlation centered at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~ 0.0 ppm in Figure 4b is assigned to $^{43}$Ca nuclei located near the hydroxyl columns, i.e., in the *core* of the nanoparticles. A comparison of the $^{43}$Ca cross-sections taken through the "surface" and "core" correlations shows that the "surface" related $^{43}$Ca spectrum is slightly broader (see Figure S8). This could be expected due to structural disorder at the surface, leading to additional distributions of chemical shift and/or quadrupolar parameters).

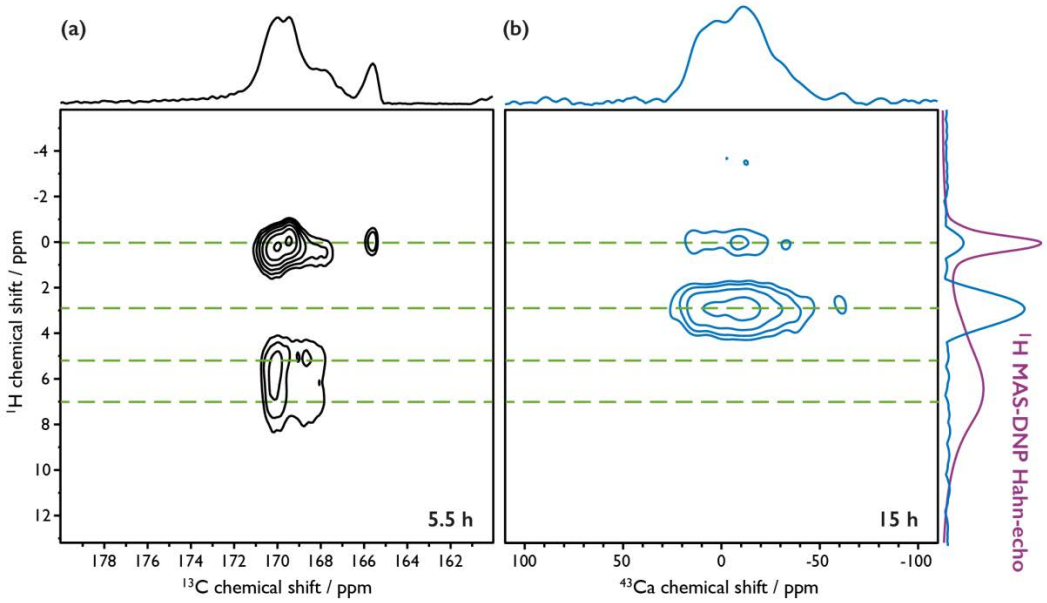



**Figure 4. MAS-DNP HETCOR spectra of C–HAp, recorded at ~100 K, 9,4 T, and using a MAS rate of 8.5 kHz. (a) $^{1}$H–$^{13}$C HETCOR spectrum with associated $^{13}$C skyline projection (top), recorded using a CP contact time of 7 ms. (b) $^{1}$H–$^{43}$Ca HETCOR spectrum with associated $^{43}$Ca (top) and $^{1}$H (right) skyline projections, recorded using a CP contact time of 3 ms. Both spectra were recorded using FSLG homonuclear decoupling[10] during the indirect acquisition and SPINAL-64 heteronuclear decoupling[34] during the direct acquisition. Also shown (far right, purple) is the DNP-enhanced $^{1}$H Hahn-echo MAS NMR spectrum, for comparison.**

The $^{1}$H-$^{13}$C HETCOR spectrum of C-HAp is presented in Figure 4a. It is clearly demonstrated that even in the case of $^{13}$C at natural abundance (1.1 %) and with only ~ 1 wt% in carbon, 2D DNP-enhanced $^{1}$H–$^{13}$C HETCOR spectra can be obtained in short experimental time (here 5.5 h). One notes also that $^{13}$C resolution remains almost identical to that observed at room temperature. Following Beshah *et al.*,[40] the most shielded $^{13}$C resonance ($\delta_{iso}(^{13}C)$ = 166.0 ppm) can be assigned to A-site carbonates whereas all deshielded resonances correspond to B-site carbonates. Looking carefully at the correlations in the 2D $^{1}$H–$^{13}$C HETCOR experiment provides more detailed information. *(i)* As expected, $^{13}$C resonances are coupled to channel $OH^-$ protons, corresponding then to "core" carbonates. *(ii)* Some B-type resonances are correlated to the most deshielded part of the $^{1}$H spectrum, corresponding then to "surface" carbonates. There seems to be two discrete $^{1}$H environments interacting with these surface carbonates: at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~ 7.0 ppm and $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~ 5.0 ppm, most likely from distinct surface $OH^-$ groups. Notably, the proton correlations related to these surface carbonates are clearly distinguished from the one related to the surface $Ca^{2+}$ cations. In other words, the multinuclear MAS-DNP experiments are selective towards the different protonated species present at the surface of the C-HAp nanoparticles. *(iii)* the A-site resonance ($\delta_{iso}(^{13}C)$ = 166.0 ppm) is mainly correlated to the $OH^-$ groups in the *c*-axis columns. *(iv)* The lack of any correlations with a peak at $\delta_{iso}(^{1}H)$ ~ 3.0 ppm (using CP contact times of 0.25, 1, and 7 ms (only the latter shown here)) allows the refinement of the previous assignment (*vide supra*). This peak must then be specifically from (hydrogen-bonded) calcium-bound hydroxyls on the surface of the nanoparticles, or from calcium-chelated glycerol molecules (which have a lesser affinity to carbonates).

## CONCLUSION

It has been demonstrated that C-HAp nanoparticles can be studied efficiently and effectively using MAS-DNP. Although $^{43}$Ca should be a fundamental NMR target in the field of biomaterials and biominerals, it suffers from severe drawbacks in terms of intrinsic sensitivity (low $\gamma$, high spin

number, and very low natural abundance). For the first time, $^{1}H–^{43}Ca$ 2D experiments could be recorded at *natural isotopic abundance* in short experimental time (~ 4 hours), notably for a restricted mass of sample (~ 30 mg). To date, such experiments would have been impossible to implement using conventional NMR. An analysis of the $^{1}H–^{43}Ca$ and $^{1}H–^{13}C$ correlation data showed that "surface" species ($Ca^{2+}$ and carbonates) could be distinguished from the "core" entities. Such results open new avenues for the detailed atomic-scale description of interfaces in bones and teeth, which is of primary importance to understand their structure and properties,[94] as well as for calcium-derived nanomaterials in general.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Carbonate substituted hydroxyapatite (C-HAp) synthesis and characterization.** The protocol used corresponded to the standard precipitation of HAp at room temperature starting from aqueous solutions (initially decarbonated by boiling the solutions and using an argon flux during the syntheses). A solution of ammonium hydrogenphosphate ($(NH_4)_2HPO_4$, 0.30 mol.$L^{-1}$, pH ~ 10) was added to a solution of calcium nitrate tetrahydrate ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$, 0.50 mol.$L^{-1}$, pH ~ 5) using a titration apparatus (808 Titrando, Methrom, 3 mL.$min^{-1}$). Carbonates were introduced by adding sodium hydrogencarbonate ($NaHCO_3$) to the phosphate solution. All experiments were performed under argon flux and magnetic stirring. The initial molar ratios were: Ca:10, P:6, $CO_3^{2-}$:3. After the addition of the phosphate solution, the obtained precipitates were further stirred for 24 hours. After centrifugation, the precipitates were rinsed 4 times with distilled water (final pH of water ~ 7). All samples were then heat treated (400°C) for 48 hours in order to eliminate water and ammonia molecules. Routine characterization (TEM, XRD, FTIR, TGA) of the sample is presented in the Supporting Information.

**Solid-state NMR experiments.** The glycerol-$d_8$ (98% in D atoms) and $D_2O$ (> 99% in D atoms) used for the glass-forming solvent matrix were standard commercial reagents and the AMUPol[56] biradical polarizing agent was purchased through SATT Sud Est, Marseille, France. Solid-state NMR experiments were recorded using a Bruker DNP-NMR AVANCE III 400 MHz spectrometer equipped with a gyrotron and associated transmission line capable of delivering ~ 5 W of ~ 264 GHz μw irradiation at the sample. All experiments were recorded with a 3.2 mm HXY triple-resonance MAS probe (in λ/4 $^{1}H$ transmission mode) at $\nu_0(^{1}H)$ = 400.33 MHz corresponding to the maximum $^{1}H$ enhancement field position for AMUPol at $\nu_0(e^-)$ = 263.7 GHz, with the X-channel tuned to $\nu_0(^{13}C)$ = 100.66 MHz and the Y-channel tuned to $\nu_0(^{43}Ca)$ = 26.94 MHz. A home-adapted triple resonance $^{1}H/^{13}C/^{43}Ca$ circuit was constructed using a 15 pF capacitor in parallel to an insert coil of 7 turns, used to bridge the X and Y channels, and also a 64 pF 'shunt' capacitance in parallel to the variable Y capacitor. The Y-channel tuning range at low temperature (~ 100 K) using this setup is 26.9 ± 0.8 MHz.

$^{1}H$ (π/2)- and π-pulses, as well as the (SPINAL-64[34]) heteronuclear decoupling, were applied to induce a nutation frequency of 100 kHz. $^{13}C$ CP spin-locking was at ~ 50 kHz with corresponding ramped (50–100%) $^{1}H$ CP spin-locking at ~ 76 kHz (100%) to meet a CP-matching condition and facilitate CP transfer. The $^{1}H$ spin-lock during $^{1}H–^{43}Ca$ CP transfer was applied in a low nutation frequency regime (~12 kHz) to permit relatively efficient CT-selective CP of $^{43}Ca$ nuclei, for which a (n=1, zero quantum) CP-matching condition was met using $^{43}Ca$ radiofrequency irradiation at ~ 0.9 kHz. A long "dead time" of 120 μs was used to avoid the acquisition of $^{43}Ca$ signals resulting from probe "ringing". For $^{13}C$ acquisition, this dead time was only 7 μs. The $^{1}H–^{43}Ca$ CP and $^{43}Ca$ direct excitation after DFS preparation were calibrated using a (60%) $^{43}Ca$-labeled sample of Mg-substituted HAp, which was synthesized using a similar protocol to that described previously.[53]

## ASSOCIATED CONTENT

*Conflict of interest:* The authors declare no competing financial interest.

*Supporting Information Available*: TEM images, powder XRD, FTIR spectra, TGA data, DNP-enhanced $^{1}H–^{1}H$ spin-diffusion data, fittings of DNP-enhanced $^{1}H-^{43}Ca$ CP MAS NMR spectra, and

further $^{1}H$-$^{13}C$ and $^{1}H$-$^{43}Ca$ HETCOR spectra. This material is available free of charge *via* the Internet at http://pubs.acs.org.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

*E-mail: gael.depaepe@cea.fr

## ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the French National Research Agency through the Labex ARCANE (ANR-11-LABX-0003-01), the "programme blanc" (ANR-12-BS08-0016-01), and the European Research Council (ERC-CoG-2015, No. 682895). The RTB is acknowledged for financial support. Katharina Märker is thanked for her help in setting up the experiments and contributions from Sabine Hediger, Frédéric Mentink-Vigier, Dimitris Sakellariou, and Jochen Lehmann-Horn are greatly appreciated.

## REFERENCES

[1] M. Bak, J. K. Thomsen, H. J. Jakobsen, S. E. Petersen, T. E. Petersen, and N. C. Nielsen, "Solid-State 13C and 31P NMR Analysis of Urinary Stones," 164, September, 856–863, **2000**.

[2] T. Gullion and J. Schaefer, "Rotational-Echo Double-Resonance NMR," *J. Magn. Reson.*, 81, 1, 196–200, **1989**.

[3] D. G. Reid, M. J. Duer, G. E. Jackson, R. C. Murray, A. L. Rodgers, and C. M. Shanahan, "Citrate Occurs Widely in Healthy and Pathological Apatitic Biomineral: Mineralized Articular Cartilage, and Intimal Atherosclerotic Plaque and Apatitic Kidney Stones," *Calcif. Tissue Int.*, 93, 3, 253–260, **2013**.

[4] D. G. Reid, G. J. Jackson, M. J. Duer, and A. L. Rodgers, "Apatite in Kidney Stones is a Molecular Composite with Glycosaminoglycans and Proteins: Evidence from Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, and Relevance to Randall's Plaque, Pathogenesis and Prophylaxis," *J. Urol.*, 185, 2, 725–30, **2011**.

[5] R. K. Harris, R. E. Wasylishen, and M. J. Duer, *NMR Crystallography*. **2009**.

[6] A. Randall, "The Origin and Growth of Renal Calculi," *Ann. Surg.*, 105, 6, 1009–1027, **1937**.

[7] D. Sakellariou, A. Lesage, P. Hodgkinson, and L. Emsley, "Homonuclear Dipolar Decoupling in Solid-State NMR Using Continuous Phase Modulation," *Chem. Phys. Lett.*, 319, 3–4, 253–260, **2000**.

[8] M. E. Halse and L. Emsley, "Improved Phase-Modulated Homonuclear Dipolar Decoupling for Solid-State NMR Spectroscopy from Symmetry Considerations," *J. Phys. Chem. A*, 117, 25, 5280–5290, **2013**.

[9] E. Vinogradov, P. K. Madhu, and S. Vega, "Phase Modulated Lee-Goldburg Magic Angle Spinning Proton Nuclear Magnetic Resonance Experiments in the Solid State: A Bimodal Floquet Theoretical Treatment," *J. Chem. Phys.*, 115, 19, 8983–9000, **2001**.

[10] A. Bielecki, A. C. Kolbert, and M. H. Levitt, "Frequency-Switched Pulse Sequences: Homonuclear Decoupling and Dilute Spin NMR in Solids," *Chem. Phys. Lett.*, 155, 4–5, 341–346, **1989**.

[11] B. C. Gerstein, R. G. Pembleton, R. C. Wilson, and L. M. Ryan, "High Resolution NMR in Randomly Oriented Solids with Homonuclear Dipolar Broadening: Combined Multiple Pulse NMR and Magic Angle Spinning," *J. Chem. Phys.*, 66, 1, 361–362, **1977**.

[12] B. C. Gerstein and H. Kimura, "Cycle Time as a Variable in CRAMPS NMR. Detection of Minor Impurities en solids to Levels of 0.01 mol%," *Appl. Magn. Reson.*, 27, 5–18, **2004**.

[13] F. Pourpoint, C. Gervais, L. Bonhomme-Coury, T. Azaïs, C. Coelho, F. Mauri, B. Alonso, F. Babonneau, and C. Bonhomme, "Calcium Phosphates and Hydroxyapatite: Solid-State NMR Experiments and First-Principles Calculations," *Appl. Magn. Reson.*, 32, 4, 435–457, **2007**.

[14] T. Echigo, M. Kimata, A. Kyono, M. Shimizu, and T. Hatta, "Re-investigation of the Crystal Structure of Whewellite [Ca(C2O4).H2O] and the Dehydration Mechanism of Caoxite [Ca(C2O4).3H2O]," *Miner. Mag.*, 69, 1, 77–88, **2005**.

[15] S. Deganello, A. R. Kampf, and P. B. Moore, "The Crystal Structure of Calcium Oxalate Trihydrate: Ca(H2O)3(C2O4)," *Am. Mineral.*, 66, 859–865, **1981**.

[16] M. Hajir, R. Graf, and W. Tremel, "Stable Amorphous Calcium Oxalate: Synthesis and Potential Intermediate in Biomineralization," *Chem. Commun.*, 50, 49, 6534–6536, **2014**.

[17] J. Ihli, Y.-W. Wang, B. Cantaert, Y.-Y. Kim, D. C. Green, P. H. H. Bomans, N. A. J. M. Sommerdijk, and F. C. Meldrum,

"Precipitation of Amorphous Calcium Oxalate in Aqueous Solution," *Chem. Mater.*, 27, 11, 3999–4007, **2015**.

[18] A. Gehl, M. Dietzsch, M. Mondeshki, S. Bach, T. Häger, M. Panthöfer, B. Barton, U. Kolb, and W. Tremel, "Anhydrous Amorphous Calcium Oxalate Nanoparticles from Ionic Liquids: Stable Crystallization Intermediates in the Formation of Whewellite," *Chem. - A Eur. J.*, 21, 50, 18192–18201, **2015**.

[19] S. Weiner, I. Sagi, and L. Addadi, "Choosing the Crystallization Path Less Traveled," *Science (80-. ).*, 309, 5737, 1027–1028, **2005**.

[20] Y. Politi, T. Arad, E. Klein, S. Weiner, and L. Addadi, "Sea Urchin Spine Calcite Forms *via* a Transient Amorphous Calcium Carbonate Phase," *Science (80-. ).*, 306, 1161–1164, **2004**.

[21] J. Aizenberg, G. Lambert, S. Weiner, and L. Addadi, "Factors Involved in the Formation of Amorphous and Crystalline Calcium Carbonate: a Study of an Ascidian Skeleton.," *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 1, 32–39, **2002**.

[22] R. J. Kirkpatrick and G. M. Bowers, "Natural Abundance 43Ca NMR as a Tool for Exploring Calcium Biomineralization: Renal Stone Formation and Growth," *Cryst. Growth Des.*, 11, 5188–5191, **2011**.

[23] V. Tazzoli and C. Domeneghetti, "The Crystal Structures of Whewellite and Weddellite: Re-examination and Comparison," *Am. Mineral.*, 65, 327–334, **1980**.

[24] H. Colas, L. Bonhomme-Coury, C. C. Diogo, F. Tielens, F. Babonneau, C. Gervais, D. Bazin, D. Laurencin, M. E. Smith, J. V. Hanna, M. Daudon, and C. Bonhomme, "Whewellite, CaC2O4.H2O: Structural Study by a Combined NMR, Crystallography and Modelling Approach," *CrystEngComm*, 15, 43, 8840, **2013**.

[25] A. Bielecki and D. P. P. Burum, "Temperature Dependence of 207Pb MAS Spectra of Solid Lead Nitrate. An Accurate, Sensitive Thermometer for Variable-Temperature MAS," *J. Magn. Reson. Ser. A*, 116, 215–220, **1995**.

[26] X. Guan and R. E. Stark, "A General Protocol for Temperature Calibration of MAS NMR Probes at Arbitrary Spinning Speeds," *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 38, 2–3, 74–76, **2010**.

[27] A. R. Grimmer, A. Kretschmer, and V. B. Cajipe, "Influence of magic angle spinning on sample temperature," *Magn. Reson. Chem.*, 35, 2, 86–90, **1997**.

[28] K. R. Thurber and R. Tycko, "Measurement of Sample Temperatures under Magic-Angle Spinning from the Chemical Shift and Spin-Lattice Relaxation Rate of 79Br in KBr Powder," *J. Magn. Reson.*, 196, 1, 84–7, **2009**.

[29] S. Deganello, "The Structure of Whewellite, CaC2O4. H2O at 328 K," *Acta Crystallogr.*, B37, 826–829, **1981**.

[30] B. Langer, L. Schnell, H. W. W. Spiess, and A. R. Grimmer, "Temperature Calibration under Ultrafast MAS Conditions," *J. Magn. Reson.*, 138, 1, 182–186, **1999**.

[31] M. Jochum, U. Werner-Zwanziger, and J. W. Zwanziger, "Observable Effects of Mechanical Stress Induced by Sample Spinning in Solid State Nuclear Magnetic Resonance," *J. Chem. Phys.*, 128, 5, **2008**.

[32] J. W. Zwanziger, U. Werner-Zwanziger, J. L. Shaw, and C. So, "Stress, strain and NMR," *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 29, 1–3, 113–118, **2006**.

[33] R. Tellgren, J. O. Thomas, and I. Olovsson, "Hydrogen Bond Studies . A Neutron Diffraction and Deformation Electron Density Study of Sodium Hydrogen Oxalate Monohydrate, NaHC2O4.H2O," *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.*, 33, 3500–3504, **1977**.

[34] B. M. Fung, A. K. Khitrin, and K. Ermolaev, "An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids," *J. Magn. Reson.*, 142, 1, 97–101, **2000**.

[35] T. Bräuniger, P. Wormald, and P. Hodgkinson, "Improved Proton Decoupling in NMR Spectroscopy of Crystalline Solids Using the SPINAL-64 Sequence," *Curr. Dev. Solid State NMR Spectrosc.*, 69–74, **2003**.

[36] J. C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. Elsevier, **1994**.

[37] M. E. Fleet, Ed., *Carbonated Hydroxyapatite: Materials, Synthesis, and Applications*. Pan Stanford Publishing Pte, Ltd, **2015**.

[38] M. E. Fleet, "Infrared Spectra of Carbonate Apatites: v2-Region Bands," *Biomaterials*, 30, 8, 1473–1481, **2009**.

[39] J. P. Yesinowski and H. Eckert, "Hydrogen Environments in Calcium Phosphates: proton MAS NMR at High Spinning Speeds," *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 21, 6274–6282, **1987**.

[40] K. Beshah, C. Rey, M. J. Glimcher, M. Schimizu, and R. G. Griffin, "Solid State Carbon-13 and Proton NMR Studies of Carbonate-Containing Calcium Phosphates and Enamel," *J. Solid State Chem.*, 84, 1, 71–81, **1990**.

[41] G. Cho, Y. Wu, and J. L. Ackerman, "Detection of Hydroxyl Ions in None Mineral by Solid-State NMR Spectroscopy," *Science*, 300, 5622, 1123–1127, **2003**.

[42] C. H. Yoder, J. D. Pasteris, K. N. Worcester, and D. V. Schermerhorn, "Structural Water in Carbonated Hydroxylapatite and Fluorapatite: Confirmation by Solid State 2H NMR," *Calcif. Tissue Int.*, 90, 1, 60–67, **2012**.

[43] W. P. Rothwell, J. S. Waugh, and J. P. Yesinowski, "High-resolution variable-temperature 31P NMR of solid calcium phosphates," *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 8, 2637–2643, **1980**.

[44] P. Gras, A. Baker, C. Combes, C. Rey, S. Sarda, A. J. Wright, M. E. Smith, J. V. Hanna, C. Gervais, D. Laurencin, and C. Bonhomme, "From Crystalline to Amorphous Calcium Pyrophosphates: A Solid State Nuclear Magnetic Resonance Perspective," *Acta Biomater.*, 31, 348–357, **2016**.

[45] C. Jäger, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, and M. Epple, "A solid-state NMR Investigation of the Structure of Nanocrystalline Hydroxyapatite," *Magn. Reson. Chem.*, 44, 6, 573–580, **2006**.

[46] Y. Wang, S. Von Euw, F. M. Fernandes, S. Cassaignon, M. Selmane, G. Laurent, G. Pehau-Arnaudet, C. Coelho, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, T. Azaïs, and N. Nassif, "Water-Mediated Structuring of Bone Apatite," *Nat. Mater.*, 12, 12, 1144–53, **2013**.

[47] H. E. Mason, A. Kozlowski, and B. L. Phillips, "Solid-state NMR Study of the Role of H and Na in AB-type Carbonate Hydroxylapatite," *Chem. Mater.*, 20, 1, 294–302, **2008**.

[48] G. Gasquères, C. Bonhomme, J. Maquet, F. Babonneau, S. Hayakawa, T. Kanaya, and A. Osaka, "Revisiting Silicate Substituted Hydroxyapatite by Solid-State NMR," *Magn. Reson. Chem.*, 46, 4, 342–346, **2008**.

[49] G. Cho and J. P. Yesinowski, "Multiple-Quantum NMR Dynamics in the Quasi-One-Dimensional Distribution of Protons in Hydroxyapatite," *Chem. Phys. Lett.*, 205, 1, 1–5, **1993**.

[50] V. Klimavicius, L. Dagys, and V. Balevicius, "Subnanoscale Order and Spin Diffusion in Complex Solids through the Processing of Cross-Polarization Kinetics," *J. Phys. Chem. C*, 120, 6, 3542–3549, **2016**.

[51] M. Ben Osman, S. Diallo-Garcia, V. Herledan, D. Brouri, T. Yoshioka, J. Kubo, Y. Millot, and G. Costentin, "Discrimination of Surface and Bulk Structure of Crystalline Hydroxyapatite Nanoparticles by NMR," *J. Phys. Chem. C*, 119, 40, 23008–23020, **2015**.

[52] S. Peroos, Z. Du, and N. H. De Leeuw, "A Computer Modelling Study of the Uptake, Structure and Distribution of Carbonate Defects in Hydroxy-apatite," *Biomaterials*, 27, 9, 2150–2161, **2006**.

[53] D. Laurencin, A. Wong, J. V. Hanna, R. Dupree, and M. E. Smith, "A High-Resolution 43Ca Solid-State NMR Study of the Calcium Sites of Hydroxyapatite," *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 8, 2412–2413, **2008**.

[54] D. Laurencin, A. Wong, R. Dupree, and M. E. Smith, "Natural Abundance 43Ca Solid-State NMR Characterisation of Hydroxyapatite: Identification of the Two Calcium Sites.," *Magn. Reson. Chem.*, 46, 4, 347–50, **2008**.

[55] C. Song, K.-N. Hu, C.-G. Joo, T. M. Swager, and R. G. Griffin, "TOTAPOL: A Biradical Polarizing Agent for Dynamic Nuclear Polarization Experiments in Aqueous Media," *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 35, 11385–11390, **2006**.

[56] C. Sauvée, M. Rosay, G. Casano, F. Aussenac, R. T. Weber, O. Ouari, and P. Tordo, "Highly Efficient, Water-Soluble Polarizing Agents for Dynamic Nuclear Polarization at High Frequency," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 52, 41, 10858–61, **2013**.

[57] K. R. Thurber, W.-M. Yau, and R. Tycko, "Low-Temperature Dynamic Nuclear Polarization at 9.4 T with a 30 mW Microwave Source," *J. Magn. Reson.*, 204, 2, 303–13, **2010**.

[58] D. Lee, S. Hediger, and G. De Paëpe, "Is Solid-State NMR Enhanced by Dynamic Nuclear Polarization ?," *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 66, 6–20, **2015**.

[59] H. Takahashi, D. Lee, L. Dubois, M. Bardet, S. Hediger, and G. De Paepe, "Rapid Natural-Abundance 2D 13C-13C Correlation Spectroscopy Using Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Solid-State NMR and Matrix-Free Sample Preparation," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51, 47, 1–5, **2012**.

[60] A. J. Rossini, A. Zagdoun, M. Lelli, A. Lesage, C. Copéret, and L. Emsley, "Dynamic Nuclear Polarization Surface Enhanced NMR Spectroscopy," *Acc. Chem. Res.*, 46, 9, 1942–51, **2013**.

[61] S. Hediger, B. H. Meier, N. D. Kurur, G. Bodenhausen, and R. R. Ernst, "NMR Cross Polarization by Adiabatic Passage through the Hartmann-Hahn Condition (APHH)," *Chem. Phys. Lett.*, 223, 4, 283–288, **1994**.

[62] M. Astala, R; Stott, "First Principles Investigation of Mineral Component of Bone: CO3 Substitutions in Hydroxyapatite," *Chem. Mater.*, 17, 16, 4125–4133, **2005**.

[63] M. Fleet, *Carbonated Hydroxyapatite*, Pan Standf. **2014**.

[64] M. Hohwy, C. M. Rienstra, C. P. Jaroniec, and R. G. Griffin, "Fivefold symmetric homonuclear dipolar recoupling in rotating solids: Application to double quantum spectroscopy," *J. Chem. Phys.*, 110, 16, 7983, **1999**.

[65] D. Laurencin, A. Wong, W. Chrzanowski, J. C. Knowles, D. Qiu, D. M. Pickup, R. J. Newport, Z. Gan, M. J. Duer, and M. E. Smith, "Probing the Calcium and Sodium Local Environment in Bones and Teeth using Multinuclear Solid State NMR and X-ray Absorption Spectroscopy," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12, 5, 1081–1091, **2010**.

[66] H. Takahashi, B. Viverge, D. Lee, P. Rannou, and G. De Paëpe, "Towards Structure Determination of Self-Assembled Peptides

using Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Solid-State NMR Spectroscopy," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 52, 27, 6979–6982, **2013**.

[67] D. Laurencin and M. E. Smith, "Development of 43Ca Solid State NMR Spectroscopy as a Probe of Local Structure in Inorganic and Molecular Materials," *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 68, 1–40, **2013**.

[68] D. L. Bryce, E. B. Bultz, and D. Aebi, "Calcium-43 Chemical Shift Tensors as Probes of Calcium Binding Environments. Insight into the Structure of the Vaterite CaCO3 Polymorph by 43 Ca Solid-State NMR Spectroscopy," *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 29, 9282–9292, **2008**.

[69] D. L. Bryce, "Calcium Binding Environments probed by 43Ca NMR Spectroscopy," *Dalt. Trans.*, 39, 37, 8593–8602, **2010**.

[70] J. Xu, P. Zhu, Z. Gan, N. Sahar, M. Tecklenburg, M. D. Morris, D. H. Kohn, and A. Ramamoorthy, "Natural-Abundance 43 Ca Solid-State NMR Spectroscopy of Bone," *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 33, 11504–11509, **2010**.

[71] D. Laurencin, C. Gervais, A. Wong, C. Coelho, F. Mauri, D. Massiot, M. E. Smith, and C. Bonhomme, "Implementation of High Resolution 43Ca Solid State NMR Spectroscopy: Toward the Elucidation of Calcium Sites in Biological Materials," *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 37, 13430–13440, **2009**.

[72] A. Wong, P. M. Aguiar, T. Charpentier, and D. Sakellariou, "A low-cost strategy for 43Ca solid-state NMR spectroscopy," *Chem. Sci.*, 2, 4, 815–818, **2011**.

[73] A. Wong, D. Laurencin, R. Dupree, and M. E. Smith, "Two-Dimensional 43Ca–1H Correlation Solid-State NMR Spectroscopy," *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 35, 1, 32–36, **2009**.

[74] K. M. N. Burgess, F. A. Perras, I. L. Moudrakovski, Y. Xu, and D. L. Bryce, "High Sensitivity and Resolution in 43Ca Solid-State NMR Experiments," *Can. J. Chem.*, 93, 8, 799–807, **2015**.

[75] D. A. Hall, D. C. Maus, G. J. Gerfen, S. J. Inati, L. R. Becerra, F. W. Dahlquist, and R. G. Griffin, "Polarization-enhanced NMR Spectroscopy of Biomolecules in Frozen Solution," *Science*, 276, 5314, 930–932, **1997**.

[76] F. Blanc, L. Sperrin, D. Lee, R. Dervişoğlu, Y. Yamazaki, S. M. Haile, G. De Paëpe, and C. P. Grey, "Dynamic Nuclear Polarization NMR of Low-γ Nuclei: Structural Insights into Hydrated Yttrium-Doped BaZrO 3," *J. Phys. Chem. Lett.*, 5, 14, 2431–2436, **2014**.

[77] T. Gutmann, J. Liu, N. Rothermel, Y. Xu, E. Jaumann, M. Werner, H. Breitzke, S. T. Sigurdsson, and G. Buntkowsky, "Natural Abundance 15N NMR by Dynamic Nuclear Polarization: Fast Analysis of Binding Sites of a Novel Amine-Carboxyl-Linked Immobilized Dirhodium Catalyst," *Chem. - A Eur. J.*, 21, 9, 3798–3805, **2015**.

[78] K. Märker, M. Pingret, J.-M. Mouesca, D. Gasparutto, S. Hediger, and G. De Paëpe, "A New Tool for NMR Crystallography: Complete 13C/15N Assignment of Organic Molecules at Natural Isotopic Abundance Using DNP-Enhanced Solid-State NMR," *J. Am. Chem. Soc.*, 137, 43, 13796–13799, **2015**.

[79] D. Lee, N. T. Duong, O. Lafon, and G. De Paëpe, "Primostrato Solid-state Nmr Enhanced by Dynamic Nuclear Polarization: Penta-coordinated Al are Only Located at the Surface of Hydrated γ-alumina," *J. Phys. Chem. C*, 118, 25065–25076, **2014**.

[80] F. Blanc, L. Sperrin, D. A. Jefferson, S. Pawsey, M. Rosay, and C. P. Grey, "Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Natural Abundance 17O Spectroscopy," *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 8, 2975–2978, **2013**.

[81] F. a. Perras, T. Kobayashi, and M. Pruski, "Natural Abundance 17 O DNP Two-Dimensional and Surface-Enhanced NMR Spectroscopy," *J. Am. Chem. Soc.*, 137, 26, 8336–8339, **2015**.

[82] F. Mentink-Vigier, Ü. Akbey, Y. Hovav, S. Vega, H. Oschkinat, and A. Feintuch, "Fast passage dynamic nuclear polarization on rotating solids," *J. Magn. Reson.*, 224, 13–21, **2012**.

[83] K. R. Thurber and R. Tycko, "Theory for Cross Effect Dynamic Nuclear Polarization under Magic-Angle Spinning in Solid State Nuclear Magnetic Resonance: the Importance of Level Crossings," *J. Chem. Phys.*, 137, 8, 084508, **2012**.

[84] F. A. Perras, J. Viger-Gravel, K. M. N. Burgess, and D. L. Bryce, "Signal Enhancement in Solid-State NMR of Quadrupolar Nuclei," *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 51–52, 1–15, **2013**.

[85] D. Iuga, H. Schäfer, R. Verhagen, and A. P. . Kentgens, "Population and Coherence Transfer Induced by Double Frequency Sweeps in Half-Integer Quadrupolar Spin Systems," *J. Magn. Reson.*, 147, 2, 192–209, **2000**.

[86] H. Takahashi, C. Fernández-de-Alba, D. Lee, V. Maurel, S. Gambarelli, M. Bardet, S. Hediger, A.-L. Barra, and G. De Paëpe, "Optimization of an Absolute Sensitivity in a Glassy Matrix during DNP-enhanced Multidimensional Solid-State NMR Experiments," *J. Magn. Reson.*, 239, 91–99, **2014**.

[87] P. J. Barrie, "Distorted Powder Lineshapes in 27 Al CP / MAS NMR Spectroscopy of Solids," *Chem. Phys. Lett.*, 208, 5–6, 486–490, **1993**.

[88] J. E. Roberts, S. Vega, and R. G. Griffin, "Two-dimensional Heteronuclear Chemical Shift Correlation Spectroscopy in rRotating Solids," *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 9, 2506–2512, **1984**.

[89] B. Grünberg, T. Emmler, E. Gedat, I. Shenderovich, G. H. Findenegg, H. Limbach, and G. Buntkowsky, "Hydrogen bonding of water confined in mesoporous silica MCM-41 and SBA-15 studied by 1H solid-state NMR.," *Chemistry*, 10, 22, 5689–96, **2004**.

[90] P. Charley and P. Saltman, "Chelation of Calcium by Lactose: Its Role in Transport Mechanisms," *Science (80-. ).*, 139, 3560, 1205–1206, **1963**.

[91] K. Fujii and W. Kondo, "Calcium Glyceroxides Formed in the System of Calcium Oxide-gGlycerol," *Zeitschrift fUr Anorg. und Allg. Chemie*, 359, 5–6, 296–304, **1968**.

[92] C. E. Bugg, "Calcium Binding to Carbohydrates. Crystal Structure of a Hydrated Calcium Bromide Complex of Lactose," *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 3, 908–913, **1973**.

[93] M. L. Dheu-Andries and S. Pérez, "Geometrical Features of Calcium—Carbohydrate Interactions," *Carbohydr. Res.*, 124, 2, 324–332, **1983**.

[94] M. J. Duer, "The Contribution of Solid-State NMR Spectroscopy to Understanding Biomineralization : Atomic and Molecular Structure of Bone," *J. Magn. Reson.*, 253, 98–110, **2015**.

[95] A. Zagdoun, A. J. Rossini, D. Gajan, A. Bourdolle, O. Ouari, M. Rosay, W. E. Maas, P. Tordo, M. Lelli, L. Emsley, A. Lesage, and C. Copéret, "Non-aqueous Solvents for DNP Surface Enhanced NMR Spectroscopy," *Chem. Commun. (Camb).*, 48, 5, 654–6, **2012**.

[96] A. Zagdoun, G. Casano, O. Ouari, M. Schwarzwälder, A. J. Rossini, F. Aussenac, M. Yulikov, G. Jeschke, C. Copéret, A. Lesage, P. Tordo, and L. Emsley, "Large Molecular Weight Nitroxide Biradicals Providing Efficient Dynamic Nuclear Polarization at Temperatures up to 200 K," *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 34, 12790–12797, **2013**.

[97] C. J. Pickard and F. Mauri, "All-electron Magnetic Response with Pseudopotentials: NMR Chemical Shifts," *Phys. Rev. B*, 63, 24, 245101, **2001**.

[98] R. Nemausat, D. Cabaret, C. Gervais, C. Brouder, N. Trcera, A. Bordage, I. Errea, and F. Mauri, "Phonon Effects on X-ray Absorption and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopies," *Phys. Rev. B*, 92, 14, 144310, **2015**.

L'approche DNP CP MAS a été adaptée avec succès à l'étude de nanoparticules d'HAp carbonatée et sodée. Le choix du couple {biradical + solvant} est fondamental (ici AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ (90/10)). Nous suggérons que l'ensemble des nanoparticules soit efficacement sondé par l'effet DNP grâce à la diffusion de spins $^1H$–$^1H$ le long des colonnes d'$OH^-$ de la structure. Toutes les expériences de double et triple résonances mises en place à partir de CHAp, *enrichie* en $^{13}C$, ont pu être transposées à l'étude de CHAp en *abondance naturelle* $^{13}C$ (à l'exception de l'expérience $^{13}C$–$^{13}C$ SPC5). Cette toute dernière expérience nous a permis de mettre en évidence pour la première fois les connectivités A/B et B/B au sein de CHAp, et ce, avec une excellente résolution globale.

Enfin, nous pensons que l'expérience $^{43}Ca$ DNP CP MAS en *abondance naturelle* ouvre un champ d'expériences encore inexplorées dans le domaine des apatites synthétiques et naturelles.

## 4. Augmentation de sensibilité par DNP MAS : oxalates de calcium hydratés synthétiques, $CaC_2O_4 \cdot nH_2O$

La dernière partie de ce Chapitre 3 est consacrée à l'étude par DNP CP MAS des différentes phases synthétiques d'oxalate de calcium hydraté, COM, COD et COT. Etant confronté à des phases minérales hydratées, nous avons tenté d'utiliser le « DNP juice » qui avait été efficace dans le cadre des études des apatites substituées par des ions carbonates et $Na^+$. Cette approche a été *un échec* comme nous allons le voir ci-dessous.

a) <u>Recherche d'un couple {solvant/biradical} compatible avec les phases COM, COD et COT</u>

La Figure 3-28 présente les spectres $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ DNP CP MAS des trois phases d'oxalate de calcium hydraté pour différentes combinaisons de solvants et de biradicaux. Nous remarquons immédiatement que le mélange AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ conduit à des valeurs de $\varepsilon(^{13}C)_{ON/OFF}$ très faibles de l'ordre de 2. Rossini *et coll*. ont proposé d'autres alternatives, mettant en jeu par exemple des solvants organiques et des biradicaux *solubles* dans ces milieux [67]. Nous avons décidé d'utiliser le tétrachloroéthane (TCE) et le chloroforme comme solvants, ainsi que TEKpol et bTbK comme biradicaux (*sans* glycérol, par ailleurs) [68] (voir Figure 3-28d). Les résultats sont troublants dans le sens où des $\varepsilon(^{13}C)_{ON/OFF}$ faibles sont observés pour COD et COT. Dans le cas particulier de COD, seul TEKpol/$CDCl_3$/$CHCl_3$ (90/10) conduit à une valeur de $\varepsilon$ supérieure à 1 ! Compte tenu des résultats présentés sur la Figure 3-28, nous avons décidé de poursuivre l'étude du COM à l'aide TEKpol/d-TCE/TCE (90/10) ($\varepsilon(^{13}C)_{ON/OFF} \sim 22$, ce qui correspond à une valeur tout à fait raisonnable pour des expériences bidimensionnelles) dans la suite de ce paragraphe.

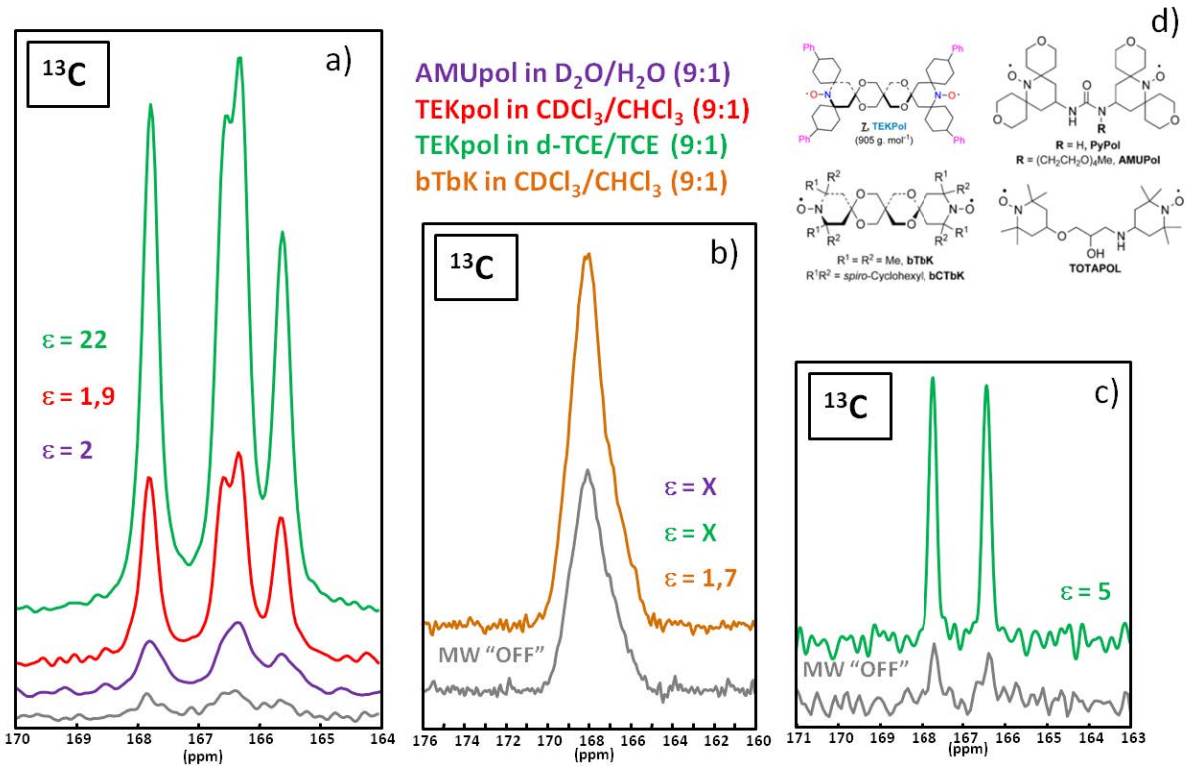



**Figure 3-28 : Tests d'efficacité ($^{13}$C DNP CP MAS) des combinaisons {solvant/biradical} pour les trois phases d'oxalate de calcium hydraté, COM, COD et COT. a) COM. b) COD. c) COT d) Schémas des biradicaux d'après** [56], [68].

L'échelle des déplacements chimiques $^{13}C$ a été calibrée en utilisant le TCE comme référence interne (74 ppm). Nous observons des variations de $\delta_{iso}(^{13}C)$ de plusieurs ppm pour le COM par rapport aux données obtenues à température ambiante, sans DNP (voir Figure 3-2). Il se peut que les $\delta_{iso}(^{13}C)$ varient effectivement avec la température. Mais la calibration faite à partir de la résonance de TCE reste sujette à caution : ***(i)*** la résonance est large à 100 K et la précision sur $\delta_{iso}(^{13}C)$ est modérée, ***(ii)*** il se peut que la résonance $^{13}C$ du TCE varie également en fonction de la température. Dans la suite de cette section, nous considérerons plutôt les *variations* de $\delta_{iso}(^{13}C)$ comme étant

significatives. Ainsi, dans le cas du COT, la différence entre les deux déplacements chimiques $^{13}C$ continue à s'accentuer avec la diminution de la température jusqu'à 100 K (voir la Figure 3-14, partie 1.b).iii.). Le spectre $^{13}C$ du COD est quant à lui beaucoup plus élargi qu'à température ambiante (voir Figure 3-2). Nous attribuons cet élargissement à une distribution de déplacements chimiques $^{13}C$ accentuée, lorsque la dynamique des molécules d'eau zéolithiques est fortement ralentie à basse température.

### b) Interprétation des cartes 2D $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ DNP HETCOR CP MAS : cas du COM

Comme mentionné précédemment, le COM peut être étudié par DNP en utilisant le mélange TEKpol/d-TCE/TCE (90/10) ($\varepsilon(^{13}C)_{ON/OFF} \sim 22$). En un temps très court (de l'ordre d'1 heure), des cartes 2D HETCOR présentant un excellent rapport signal/bruit sont obtenues pour différents temps de contact, $\tau_{CP}$, de 250 µs à 9 ms (Figure 3-29). Comme précédemment, un découplage homonucléaire $^{1}H$–$^{1}H$ de type FSLG (*Frequency Switched Lee-Goldburg*) [10] a été utilisé de façon à améliorer la résolution $^{1}H$ sur la voie indirecte.

| | C3 | C1 | C4 | C2 |
|---|---|---|---|---|
| H12 | 2,4343 | 3,4901 | 3,2072 | 3,9966 |
| H22 | 3,7803 | 3,2206 | 3,763 | 3,2692 |
| H21 | 2,4147 | 3,2357 | 3,8873 | 3,1032 |
| H11 | 3,7672 | 3,2043 | 2,3223 | 3,3691 |

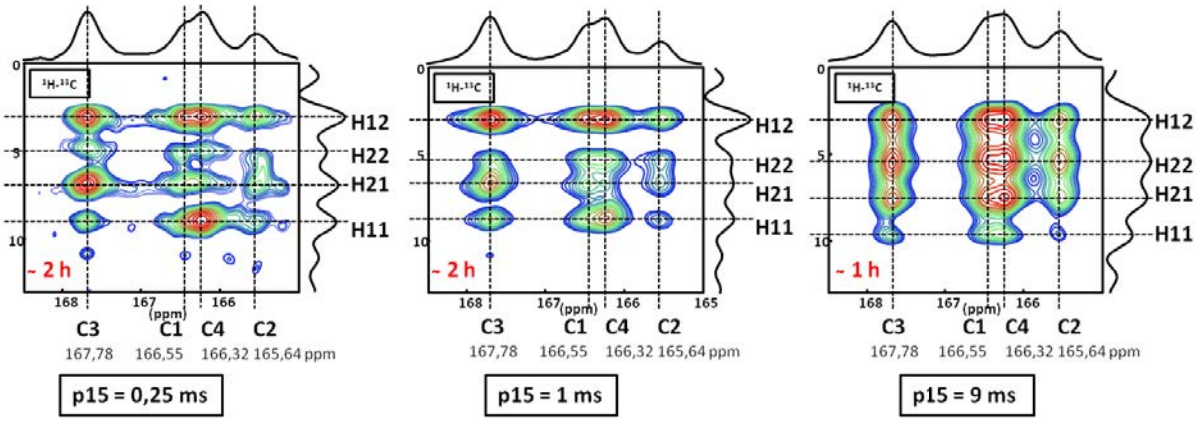



**Figure 3-29 : Spectres 2D $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ DNP HETCOR CP MAS du COM (TEKpol/TCE-d/TCE) (90/10) à trois temps de contact ($\tau_{CP}$) différents. Le tableau présente les distances C–H extraites de l'optimisation de la structure du COM par DFT [24]. Code couleurs : rouge : C–H < 2,44 Å ; jaune : 3,20 Å < C–H < 3,27 Å ; vert : 3,35 Å < C–H.**

Pour un long temps de contact ($\tau_{CP}$ = 9 ms), une carte 2D particulièrement résolue sur la dimension $^{1}H$ est obtenue. Rappelons qu'à température ambiante, le spectre $^{1}H$ CRAMPS du COM (Figure 3-1) ne présentait pas de résolution particulière. On observe 16 corrélations distinctes ! Rappelons que la structure du COM met en jeu 4 sites $^{13}C$ inéquivalents et 4 sites $^{1}H$ inéquivalents (2 molécules d'eau). Nous en déduisons que les 16 corrélations de la carte 2D correspondent aux couplages dipolaires $^{1}H$–$^{13}C$ entre tous les $^{13}C/^{1}H$ pris deux à deux. Le signal $^{1}H$ dû au solvant ne perturbe quasiment pas l'observation des pics relatifs à la phase COM. La diminution progressive du temps de contact, $\tau_{CP}$, permet de faire varier l'intensité des corrélations : ainsi, à très court temps de contact (250 µs) il est possible de mettre en évidence les connectivités spatiales entre $^{13}C$ et $^{1}H$ les plus proches. Colas *et coll.* [24] ont étudié en détails l'optimisation par DFT de la structure du COM en vue de calculer les paramètres RMN associés par la méthode GIPAW [69]. Pour rappel dans le Chapitre 2, nous avons présentés très brièvement les principes de la DFT et des ingrédients nécessaires aux calculs GIPAW.

A partir des modèles structuraux optimisés du COM, il est possible de dresser un tableau des connectivités entre atomes $C_i$ et $H_j$ de la structure : celui-ci est présenté sur la Figure 3-29 avec un code de couleurs qui est explicité dans la légende. La numérotation des atomes correspond à celle utilisée dans l'article de Colas *et coll.* L'attribution des déplacements chimiques $^{1}H$ ne pose pas de problème particulier : les résultats extraits de GIPAW donnent : 2,6 ; 5,6 ; 6,1 et 9,1 ppm [24] pour les valeurs isotropes calculées. Il est donc possible d'attribuer les résonances de $H_{12,22,21,11}$ (voir Figure 3-29). Le tableau des connectivités prouve que C3 et C2 correspondent aux résonances extrêmes en termes de déblindage et de blindage, respectivement. Cette analyse est tout à fait cohérente avec les résultats ($^{13}C$) obtenus par GIPAW. La distinction entre C1 et C4 est sans ambiguïté également. Sur la Figure 3-30, nous présentons une comparaison des spectres expérimentaux du COM à température ambiante, et à ~ 100 K, et du spectre calculé par GIPAW (à 0 K).

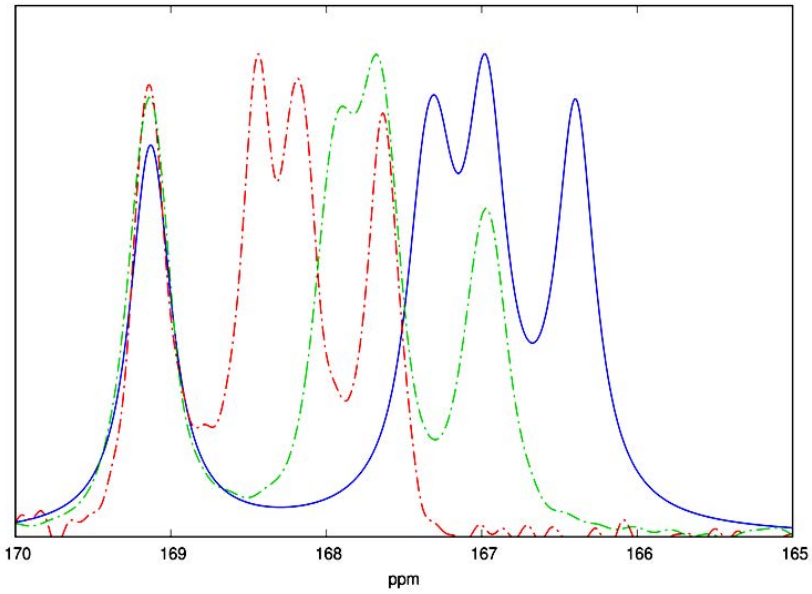



**Figure 3-30 : Comparaison de spectres $^{13}C$ de COM expérimentaux avec un spectre calculé. En pointillés rouges : spectre CP MAS à $T_{amb}$, en pointillés verts : spectre CP DNP MAS à 100 K et en bleu : le spectre calculé par méthode GIPAW à 0 K.**

Le spectre à l'ambiante a été référencé grâce à l'adamantane, ensuite les deux autres spectres ont été alignés suivant leur signal le plus déblindé (fixé à 169,78 ppm). L'accord est tout à fait impressionnant lorsque nous considérons le spectre à basse température. De fait, à 100 K, les conditions d'enregistrement des spectres RMN se rapprochent considérablement de la température utilisée pour les calculs *ab intio*. En d'autres termes, la RMN cristallographique va bénéficier dans un futur proche de la généralisation des expériences MAS effectuées à 100 K, voire à 40 K, en routine. Du côté théorique, il sera très intéressant de confronter l'approche développée par Némausat *et coll*. [70] qui prend explicitement en compte la présence de phonons dans le calcul des paramètres RMN. Le domaine des oxalates de calcium hydratés offre une plateforme expérimentale/théorique tout à fait intéressante dans ce cadre (voir également les expériences en $^{23}Na$ présentées ci-dessus – partie 3.b).).

Par curiosité, nous avons réitéré les expériences précédentes à l'aide du mélange AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ (90/10) ($\varepsilon(^{13}C)_{ON/OFF}$ ~ 2). Ici, le gain DNP est minime ce qui se traduit par des temps d'acquisition beaucoup plus longs (7 à 15 heures, voir Figure 3-31). Il n'a pas été possible d'enregistrer une carte

2D pour un temps de contact de 250 µs dans un temps raisonnable. Pour $\tau_{CP}$ = 2 ms, il semble que les corrélations associées à $H_{21}$ soient plus intenses que dans le cas du mélange TEKpol/d-TCE /TCE (90/10) (Figure 3-29). Il en résulte que les résultats d'une expérience de DNP doivent toujours être considérés avec précaution et qu'un nombre important de tests et expériences est nécessaire pour obtenir des conclusions solides.

| | C3 | C1 | C4 | C2 |
|---|---|---|---|---|
| H12 | 2,4343 | 3,4901 | 3,2072 | 3,9966 |
| H22 | 3,7803 | 3,2206 | 3,763 | 3,2692 |
| H21 | 2,4147 | 3,2357 | 3,8873 | 3,1032 |
| H11 | 3,7672 | 3,2043 | 2,3223 | 3,3691 |

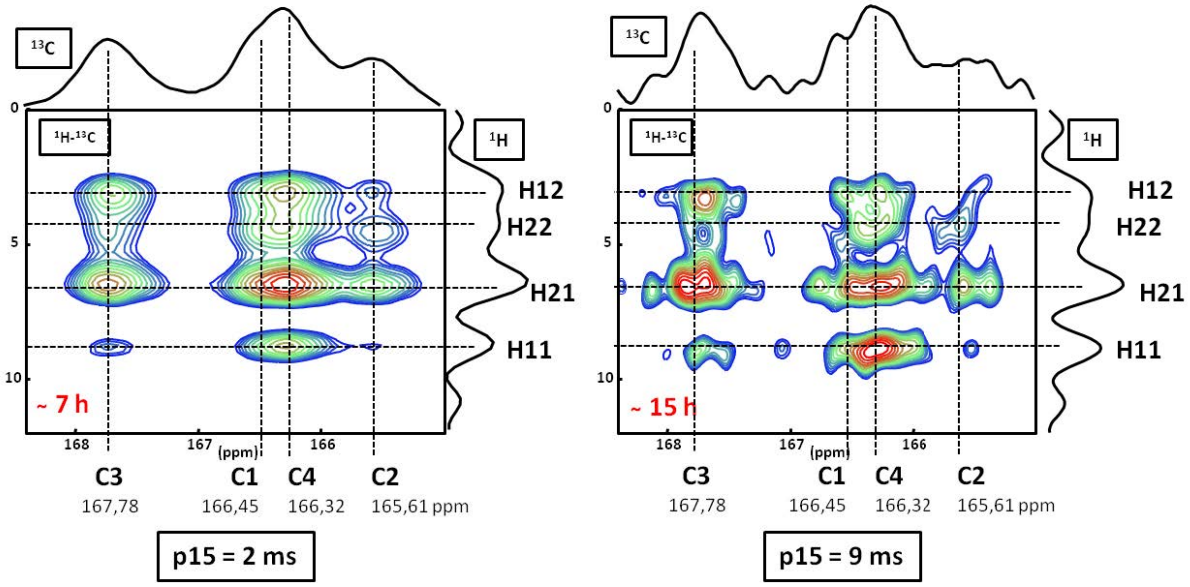



**Figure 3-31 : Spectres 2D $^{1}H \rightarrow {}^{31}C$ DNP HETCOR CP MAS du COM (AMUpol/$D_2O$/$H_2O$) à deux temps de contacts différents ($\tau_{CP}$ = 2 et 9 ms).**

## 5. Conclusion

Au cours de ce Chapitre, nous avons étudié systématiquement les composés synthétiques (oxalates de calcium hydratés et hydroxyapatite carbonatée et sodée) décrits précédemment (voir Chapitre1).

Dans un premier temps, les phases COM, COD et COT ont été étudiées par RMN haute résolution $^{1}H$ CRAMPS, $^{13}C$ CP MAS et $^{43}Ca$ MAS (à ultra haut champ magnétique). Les spectres $^{1}H$ CRAMPS sont particulièrement résolus par rapport aux spectres MAS, et caractéristiques des différents hydrates. En revanche, leur interprétation reste délicate car des phénomènes de dynamique locale peuvent éventuellement interférer avec le découplage homonucléaire. Les spectres $^{43}Ca$ MAS présentent des rapports S/N tout à fait acceptables. Néanmoins, les valeurs $\delta_{iso}(^{43}Ca)$ et $C_Q(^{43}Ca)$ sont très proches pour les trois phases COM, COD et COT. Les spectres $^{13}C$ CP MAS sont particulièrement sensibles à des effets de température (voir de pression). La phase COM, probablement la plus étudiée actuellement, présente une variabilité assez grande quant aux signatures obtenues par RMN $^{13}C$ CP MAS (gardons néanmoins à l'esprit que les variations de $\delta_{iso}(^{13}C)$ << 1 ppm). Cela démontre que la RMN $^{13}C$ est ici particulièrement sensible à toute variation d'angle, de longueur de liaisons et ce probablement au niveau du réseau de liaisons–H créé par les molécules d'eau de la structure.

Notons également qu'une composante de type ACO (oxalate de calcium amorphe) est très certainement présente dans de nombreux échantillons. Nous pensons que les résultats présentés dans cette première partie pourront être d'utilité pour les cliniciens et viendront compléter utilement les données FTIR et Raman.

La seconde partie du Chapitre a été de nature plus méthodologique et a permis de mettre en place un protocole robuste d'expériences de DNP CP MAS. Dans le cas des nanoparticules d'apatite substituée (par des carbonates et des ions $Na^+$), des gains $\varepsilon$ de l'ordre de 25 ont été obtenus pour tous les noyaux considérés : $^{1}H$, $^{13}C$, $^{31}P$, $^{23}Na$. Remarquablement, des expériences 2D double et triple résonances présentant un excellent rapport signal/bruit, ont été obtenues en quelques heures seulement. Il est donc démontré que l'approche DNP CP MAS permet de contourner le problème de sensibilité induit par le faible pourcentage massique des substituants et la faible abondance naturelle de certains noyaux (par exemple $^{13}C$).

L'étude des phases COM, COD et COT par DNP CP MAS a soulevé plusieurs points importants : ***(i)*** le choix du « DNP juice » adéquat pour le COM ne permet pas d'obtenir des gains $\varepsilon$ significatifs pour COD et COT, ***(ii)*** dans le cas de COM et le mélange {AMUpol/$D_2O$/$H_2O$} (90/10), des corrélations HETCOR ont pu être obtenues en 1 à 2 heures. A T ~ 100 K, la résolution $^{1}H$ (sous découplage homonucléaire FSLG) est suffisante pour distinguer les résonances individuelles associées aux quatre protons ($H_{11}$, $_{12}$, $_{21}$, $_{22}$) de la structure. En combinant les expériences avec des calculs GIPAW établis à partir de structures optimisées par DFT du COM, nous avons pu attribuer toutes les résonances $^{1}H$ et $^{13}C$. Une remarque importante s'impose à ce stade : nous avons montré que les résonances $^{13}C$ du COM étaient sensibles à la température, que ce soit lors d'une augmentation (haute fréquence de rotation MAS), ou une diminution importante de T (~ 100 K). En particulier, à 100 K deux résonances (C1 et C4) « se croisent ». Il en résulte que la comparaison entre valeurs calculées (à 0 K) et expérimentales est de bien meilleure qualité lorsque ces dernières sont enregistrées à 100 K. Dans les années à venir, l'expérience DNP MAS sera conduite à des températures de ~ 10 à 40 K (voir par exemple les travaux récents de G. De Paëpe et D. Lee dans ce domaine), ce qui rendra la combinaison « expériences/GIPAW » encore plus performante, ***(iii)*** à T ~ 100 K, les résonances $^{13}C$ du COM sont beaucoup plus résolues qu'à température ambiante. Nous attribuons ce résultat à un état de cristallisation plus important à 100 K. En d'autres termes, la « variabilité » des spectres $^{13}C$ du COM (évoquée ci-dessus) peut sans doute être expliquée par des effets de température qui modifient de manière subtile l'environnement local des groupements oxalates. ***(iv)*** contrairement aux nanoparticules d'HAp, les cristaux de COM étudiés ici sont beaucoup plus volumineux (2 à 30 µm). Il faut garder à l'esprit que l'effet DNP n'est sans doute pas transmis au cœur des cristaux (malgré la diffusion de spins $^{1}H$–$^{1}H$). Nous n'avons pas tenté d'estimer l'épaisseur de cristal effectivement sondée par DNP.

Le Chapitre 4 s'attache aux caractérisations structurales des composés naturels : calculs rénaux et plaques de Randall. Nous allons utiliser largement les résultats acquis au cours du Chapitre 3.

## Bibliographie Chapitre 3 :


[1] M. Bak, J. K. Thomsen, H. J. Jakobsen, S. E. Petersen, T. E. Petersen, and N. C. Nielsen, "Solid-State $^{13}C$ and $^{31}P$ NMR Analysis of Urinary Stones," 164, September, 856–863, **2000**.

[2] T. Gullion and J. Schaefer, "Rotational-Echo Double-Resonance NMR," *J. Magn. Reson.*, 81, 1, 196–200, **1989**.

[3] D. G. Reid, M. J. Duer, G. E. Jackson, R. C. Murray, A. L. Rodgers, and C. M. Shanahan, "Citrate Occurs Widely in Healthy and Pathological Apatitic Biomineral: Mineralized Articular Cartilage, and Intimal Atherosclerotic Plaque and Apatitic Kidney Stones," *Calcif. Tissue Int.*, 93, 3, 253–260, **2013**.

[4] D. G. Reid, G. J. Jackson, M. J. Duer, and A. L. Rodgers, "Apatite in Kidney Stones is a Molecular Composite with Glycosaminoglycans and Proteins: Evidence from Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, and Relevance to Randall's Plaque, Pathogenesis and Prophylaxis," *J. Urol.*, 185, 2, 725–30, **2011**.

[5] R. K. Harris, R. E. Wasylishen, and M. J. Duer, *NMR Crystallography*. **2009**.

[6] A. Randall, "The Origin and Growth of Renal Calculi," *Ann. Surg.*, 105, 6, 1009–1027, **1937**.

[7] D. Sakellariou, A. Lesage, P. Hodgkinson, and L. Emsley, "Homonuclear Dipolar Decoupling in Solid-State NMR Using Continuous Phase Modulation," *Chem. Phys. Lett.*, 319, 3–4, 253–260, **2000**.

[8] M. E. Halse and L. Emsley, "Improved Phase-Modulated Homonuclear Dipolar Decoupling for Solid-State NMR Spectroscopy from Symmetry Considerations," *J. Phys. Chem. A*, 117, 25, 5280–5290, **2013**.

[9] E. Vinogradov, P. K. Madhu, and S. Vega, "Phase Modulated Lee-Goldburg Magic Angle Spinning Proton Nuclear Magnetic Resonance Experiments in the Solid State: A Bimodal Floquet Theoretical Treatment," *J. Chem. Phys.*, 115, 19, 8983–9000, **2001**.

[10] A. Bielecki, A. C. Kolbert, and M. H. Levitt, "Frequency-Switched Pulse Sequences: Homonuclear Decoupling and Dilute Spin NMR in Solids," *Chem. Phys. Lett.*, 155, 4–5, 341–346, **1989**.

[11] B. C. Gerstein, R. G. Pembleton, R. C. Wilson, and L. M. Ryan, "High Resolution NMR in Randomly Oriented Solids with Homonuclear Dipolar Broadening: Combined Multiple Pulse NMR and Magic Angle Spinning," *J. Chem. Phys.*, 66, 1, 361–362, **1977**.

[12] B. C. Gerstein and H. Kimura, "Cycle Time as a Variable in CRAMPS NMR. Detection of Minor Impurities en solids to Levels of 0.01 mol%," *Appl. Magn. Reson.*, 27, 5–18, **2004**.

[13] F. Pourpoint, C. Gervais, L. Bonhomme-Coury, T. Azaïs, C. Coelho, F. Mauri, B. Alonso, F. Babonneau, and C. Bonhomme, "Calcium Phosphates and Hydroxyapatite: Solid-State NMR Experiments and First-Principles Calculations," *Appl. Magn. Reson.*, 32, 4, 435–457, **2007**.

[14] T. Echigo, M. Kimata, A. Kyono, M. Shimizu, and T. Hatta, "Re-investigation of the Crystal Structure of Whewellite [$Ca(C_2O_4)\cdot H_2O$] and the Dehydration Mechanism of Caoxite [$Ca(C_2O_4)\cdot 3H_2O$]," *Miner. Mag.*, 69, 1, 77–88, **2005**.

[15] S. Deganello, A. R. Kampf, and P. B. Moore, "The Crystal Structure of Calcium Oxalate

Trihydrate: Ca($H_2O$)3($C_2O_4$)," *Am. Mineral.*, 66, 859–865, **1981**.

[16] M. Hajir, R. Graf, and W. Tremel, "Stable Amorphous Calcium Oxalate: Synthesis and Potential Intermediate in Biomineralization," *Chem. Commun.*, 50, 49, 6534–6536, **2014**.

[17] J. Ihli, Y.-W. Wang, B. Cantaert, Y.-Y. Kim, D. C. Green, P. H. H. Bomans, N. A. J. M. Sommerdijk, and F. C. Meldrum, "Precipitation of Amorphous Calcium Oxalate in Aqueous Solution," *Chem. Mater.*, 27, 11, 3999–4007, **2015**.

[18] A. Gehl, M. Dietzsch, M. Mondeshki, S. Bach, T. Häger, M. Panthöfer, B. Barton, U. Kolb, and W. Tremel, "Anhydrous Amorphous Calcium Oxalate Nanoparticles from Ionic Liquids: Stable Crystallization Intermediates in the Formation of Whewellite," *Chem. - A Eur. J.*, 21, 50, 18192–18201, **2015**.

[19] S. Weiner, I. Sagi, and L. Addadi, "Choosing the Crystallization Path Less Traveled," *Science*, 309, 5737, 1027–1028, **2005**.

[20] Y. Politi, T. Arad, E. Klein, S. Weiner, and L. Addadi, "Sea Urchin Spine Calcite Forms *via* a Transient Amorphous Calcium Carbonate Phase," *Science*, 306, 1161–1164, **2004**.

[21] J. Aizenberg, G. Lambert, S. Weiner, and L. Addadi, "Factors Involved in the Formation of Amorphous and Crystalline Calcium Carbonate: a Study of an Ascidian Skeleton.," *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 1, 32–39, **2002**.

[22] R. J. Kirkpatrick and G. M. Bowers, "Natural Abundance $^{43}$Ca NMR as a Tool for Exploring Calcium Biomineralization: Renal Stone Formation and Growth," *Cryst. Growth Des.*, 11, 5188–5191, **2011**.

[23] V. Tazzoli and C. Domeneghetti, "The Crystal Structures of Whewellite and Weddellite: Re-examination and Comparison," *Am. Mineral.*, 65, 327–334, **1980**.

[24] H. Colas, L. Bonhomme-Coury, C. C. Diogo, F. Tielens, F. Babonneau, C. Gervais, D. Bazin, D. Laurencin, M. E. Smith, J. V. Hanna, M. Daudon, and C. Bonhomme, "Whewellite, $CaC_2O_4{\cdot}H_2O$: Structural Study by a Combined NMR, Crystallography and Modelling Approach," *CrystEngComm*, 15, 43, 8840, **2013**.

[25] A. Bielecki and D. P. P. Burum, "Temperature Dependence of $^{207}$Pb MAS Spectra of Solid Lead Nitrate. An Accurate, Sensitive Thermometer for Variable-Temperature MAS," *J. Magn. Reson. Ser. A*, 116, 215–220, **1995**.

[26] X. Guan and R. E. Stark, "A General Protocol for Temperature Calibration of MAS NMR Probes at Arbitrary Spinning Speeds," *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 38, 2–3, 74–76, **2010**.

[27] A. R. Grimmer, A. Kretschmer, and V. B. Cajipe, "Influence of Magic Angle Spinning on Sample Temperature," *Magn. Reson. Chem.*, 35, 2, 86–90, **1997**.

[28] K. R. Thurber and R. Tycko, "Measurement of Sample Temperatures under Magic-Angle Spinning from the Chemical Shift and Spin-Lattice Relaxation Rate of $^{79}$Br in KBr Powder," *J. Magn. Reson.*, 196, 1, 84–7, **2009**.

[29] S. Deganello, "The Structure of Whewellite, $CaC_2O_4{\cdot}H_2O$ at 328 K," *Acta Crystallogr.*, B37, 826–829, **1981**.

[30] B. Langer, L. Schnell, H. W. W. Spiess, and A. R. Grimmer, "Temperature Calibration under Ultrafast MAS Conditions," *J. Magn. Reson.*, 138, 1, 182–186, **1999**.

[31] M. Jochum, U. Werner-Zwanziger, and J. W. Zwanziger, “Observable Effects of Mechanical Stress Induced by Sample Spinning in Solid State Nuclear Magnetic Resonance,” *J. Chem. Phys.*, 128, 5, **2008**.

[32] J. W. Zwanziger, U. Werner-Zwanziger, J. L. Shaw, and C. So, “Stress, Strain and NMR,” *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 29, 1–3, 113–118, **2006**.

[33] R. Tellgren, J. O. Thomas, and I. Olovsson, “Hydrogen Bond Studies . A Neutron Diffraction and Deformation Electron Density Study of Sodium Hydrogen Oxalate Monohydrate, NaHC2O4.H2O,” *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.*, 33, 3500–3504, **1977**.

[34] B. M. Fung, A. K. Khitrin, and K. Ermolaev, “An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids,” *J. Magn. Reson.*, 142, 1, 97–101, **2000**.

[35] T. Bräuniger, P. Wormald, and P. Hodgkinson, “Improved Proton Decoupling in NMR Spectroscopy of Crystalline Solids Using the SPINAL-64 Sequence,” *Curr. Dev. Solid State NMR Spectrosc.*, 69–74, **2003**.

[36] J. C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. Elsevier, **1994**.

[37] M. E. Fleet, Ed., *Carbonated Hydroxyapatite: Materials, Synthesis, and Applications*. Pan Stanford Publishing Pte, Ltd, **2015**.

[38] M. E. Fleet, “Infrared Spectra of Carbonate Apatites: v2-Region Bands,” *Biomaterials*, 30, 8, 1473–1481, **2009**.

[39] J. P. Yesinowski and H. Eckert, “Hydrogen Environments in Calcium Phosphates: Proton MAS NMR at High Spinning Speeds,” *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 21, 6274–6282, **1987**.

[40] K. Beshah, C. Rey, M. J. Glimcher, M. Schimizu, and R. G. Griffin, “Solid State Carbon-13 and Proton NMR Studies of Carbonate-Containing Calcium Phosphates and Enamel,” *J. Solid State Chem.*, 84, 1, 71–81, **1990**.

[41] G. Cho, Y. Wu, and J. L. Ackerman, “Detection of Hydroxyl Ions in None Mineral by Solid-State NMR Spectroscopy,” *Science*, 300, 5622, 1123–1127, **2003**.

[42] C. H. Yoder, J. D. Pasteris, K. N. Worcester, and D. V. Schermerhorn, “Structural Water in Carbonated Hydroxylapatite and Fluorapatite: Confirmation by Solid State $^{2}$H NMR,” *Calcif. Tissue Int.*, 90, 1, 60–67, **2012**.

[43] W. P. Rothwell, J. S. Waugh, and J. P. Yesinowski, “High-resolution variable-temperature $^{31}$P NMR of solid calcium phosphates,” *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 8, 2637–2643, **1980**.

[44] P. Gras, A. Baker, C. Combes, C. Rey, S. Sarda, A. J. Wright, M. E. Smith, J. V. Hanna, C. Gervais, D. Laurencin, and C. Bonhomme, “From Crystalline to Amorphous Calcium Pyrophosphates: A Solid State Nuclear Magnetic Resonance Perspective,” *Acta Biomater.*, 31, 348–357, **2016**.

[45] C. Jäger, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, and M. Epple, “A solid-state NMR Investigation of the Structure of Nanocrystalline Hydroxyapatite,” *Magn. Reson. Chem.*, 44, 6, 573–580, **2006**.

[46] Y. Wang, S. Von Euw, F. M. Fernandes, S. Cassaignon, M. Selmane, G. Laurent, G. Pehau-Arnaudet, C. Coelho, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, T. Azaïs, and N. Nassif, “Water-Mediated Structuring of Bone Apatite,” *Nat. Mater.*, 12, 12, 1144–53, **2013**.

[47] H. E. Mason, A. Kozlowski, and B. L. Phillips, “Solid-state NMR Study of the Role of H and Na in

AB-type Carbonate Hydroxylapatite," *Chem. Mater.*, 20, 1, 294–302, **2008**.

[48] G. Gasquères, C. Bonhomme, J. Maquet, F. Babonneau, S. Hayakawa, T. Kanaya, and A. Osaka, "Revisiting Silicate Substituted Hydroxyapatite by Solid-State NMR," *Magn. Reson. Chem.*, 46, 4, 342–346, **2008**.

[49] G. Cho and J. P. Yesinowski, "Multiple-Quantum NMR Dynamics in the Quasi-One-Dimensional Distribution of Protons in Hydroxyapatite," *Chem. Phys. Lett.*, 205, 1, 1–5, **1993**.

[50] V. Klimavicius, L. Dagys, and V. Balevicius, "Subnanoscale Order and Spin Diffusion in Complex Solids through the Processing of Cross-Polarization Kinetics," *J. Phys. Chem. C*, 120, 6, 3542–3549, **2016**.

[51] M. Ben Osman, S. Diallo-Garcia, V. Herledan, D. Brouri, T. Yoshioka, J. Kubo, Y. Millot, and G. Costentin, "Discrimination of Surface and Bulk Structure of Crystalline Hydroxyapatite Nanoparticles by NMR," *J. Phys. Chem. C*, 119, 40, 23008–23020, **2015**.

[52] S. Peroos, Z. Du, and N. H. De Leeuw, "A Computer Modelling Study of the Uptake, Structure and Distribution of Carbonate Defects in Hydroxy-apatite," *Biomaterials*, 27, 9, 2150–2161, **2006**.

[53] D. Laurencin, A. Wong, J. V. Hanna, R. Dupree, and M. E. Smith, "A High-Resolution $^{43}$Ca Solid-State NMR Study of the Calcium Sites of Hydroxyapatite," *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 8, 2412–2413, **2008**.

[54] D. Laurencin, A. Wong, R. Dupree, and M. E. Smith, "Natural Abundance $^{43}$Ca Solid-State NMR Characterisation of Hydroxyapatite: Identification of the Two Calcium Sites.," *Magn. Reson. Chem.*, 46, 4, 347–50, **2008**.

[55] C. Song, K.-N. Hu, C.-G. Joo, T. M. Swager, and R. G. Griffin, "TOTAPOL: A Biradical Polarizing Agent for Dynamic Nuclear Polarization Experiments in Aqueous Media," *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 35, 11385–11390, **2006**.

[56] C. Sauvée, M. Rosay, G. Casano, F. Aussenac, R. T. Weber, O. Ouari, and P. Tordo, "Highly Efficient, Water-Soluble Polarizing Agents for Dynamic Nuclear Polarization at High Frequency," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 52, 41, 10858–61, **2013**.

[57] K. R. Thurber, W.-M. Yau, and R. Tycko, "Low-Temperature Dynamic Nuclear Polarization at 9.4 T with a 30 mW Microwave Source," *J. Magn. Reson.*, 204, 2, 303–13, **2010**.

[58] D. Lee, S. Hediger, and G. De Paëpe, "Is Solid-State NMR Enhanced by Dynamic Nuclear Polarization ?," *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 66, 6–20, **2015**.

[59] H. Takahashi, D. Lee, L. Dubois, M. Bardet, S. Hediger, and G. De Paepe, "Rapid Natural-Abundance 2D $^{13}$C-$^{13}$C Correlation Spectroscopy Using Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Solid-State NMR and Matrix-Free Sample Preparation," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51, 47, 1–5, **2012**.

[60] A. J. Rossini, A. Zagdoun, M. Lelli, A. Lesage, C. Copéret, and L. Emsley, "Dynamic Nuclear Polarization Surface Enhanced NMR Spectroscopy," *Acc. Chem. Res.*, 46, 9, 1942–51, **2013**.

[61] S. Hediger, B. H. Meier, N. D. Kurur, G. Bodenhausen, and R. R. Ernst, "NMR Cross Polarization by Adiabatic Passage through the Hartmann-Hahn Condition (APHH)," *Chem. Phys. Lett.*, 223, 4, 283–288, **1994**.

[62] M. Astala, R; Stott, "First Principles Investigation of Mineral Component of Bone: $CO_3$ Substitutions in Hydroxyapatite," *Chem. Mater.*, 17, 16, 4125–4133, **2005**.

[63] M. E. Fleet, Ed., *Carbonated Hydroxyapatite: Materials, Synthesis, and Applications*. Pan Stanford Publishing Pte, Ltd, **2014**.

[64] M. Hohwy, C. M. Rienstra, C. P. Jaroniec, and R. G. Griffin, "Fivefold Symmetric Homonuclear Dipolar Recoupling in Rotating Solids: Application to Double Quantum Spectroscopy," *J. Chem. Phys.*, 110, 16, 7983, **1999**.

[65] D. Laurencin, A. Wong, W. Chrzanowski, J. C. Knowles, D. Qiu, D. M. Pickup, R. J. Newport, Z. Gan, M. J. Duer, and M. E. Smith, "Probing the Calcium and Sodium Local Environment in Bones and Teeth using Multinuclear Solid State NMR and X-ray Absorption Spectroscopy," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12, 5, 1081–1091, **2010**.

[66] H. Takahashi, B. Viverge, D. Lee, P. Rannou, and G. De Paëpe, "Towards Structure Determination of Self-Assembled Peptides using Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Solid-State NMR Spectroscopy," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 52, 27, 6979–6982, **2013**.

[67] A. Zagdoun, A. J. Rossini, D. Gajan, A. Bourdolle, O. Ouari, M. Rosay, W. E. Maas, P. Tordo, M. Lelli, L. Emsley, A. Lesage, and C. Copéret, "Non-aqueous Solvents for DNP Surface Enhanced NMR Spectroscopy," *Chem. Commun.*, 48, 5, 654–6, **2012**.

[68] A. Zagdoun, G. Casano, O. Ouari, M. Schwarzwälder, A. J. Rossini, F. Aussenac, M. Yulikov, G. Jeschke, C. Copéret, A. Lesage, P. Tordo, and L. Emsley, "Large Molecular Weight Nitroxide Biradicals Providing Efficient Dynamic Nuclear Polarization at Temperatures up to 200 K," *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 34, 12790–12797, **2013**.

[69] C. J. Pickard and F. Mauri, "All-electron Magnetic Response with Pseudopotentials: NMR Chemical Shifts," *Phys. Rev. B*, 63, 24, 245101, **2001**.

[70] R. Nemausat, D. Cabaret, C. Gervais, C. Brouder, N. Trcera, A. Bordage, I. Errea, and F. Mauri, "Phonon Effects on X-ray Absorption and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopies," *Phys. Rev. B*, 92, 14, 144310, **2015**.

# Chapitre 4 : RMN et DNP multinucléaire appliquées aux calcifications pathologiques : calculs rénaux et plaque de Randall

**1. Caractérisations usuelles des calculs rénaux ..... 174**
a) La spectroscopie FTIR : un outil courant de diagnostic médical ..... 174
b) Diffraction des rayons X sur poudre ..... 175

**2. Les méthodes de RMN appliquées aux calculs rénaux ..... 176**
a) Caractérisation des phases par RMN $^{1}$H, $^{13}$C, $^{43}$Ca, $^{29}$Si et $^{27}$Al ..... 176
i. $^{1}$H DUMBO MAS (CRAMPS), écho de Hahn et DQF COSY ..... 177
ii. $^{13}$C CP MAS et $^{1}$H–$^{13}$C INEPT MAS ..... 180
iii. $^{43}$Ca MAS ..... 181
iv. $^{29}$Si et $^{27}$Al : l'exemple de KS 3 ..... 183
b) Etude par RMN de la matrice organique : échantillon KS 3 ..... 184
c) Les phosphates de "trame" : étude par RMN $^{31}$P MAS et CP MAS ..... 186
d) "La" plaque de Randall : un challenge spectroscopique ..... 189

**3. RMN DNP MAS : applications à l'étude des calculs rénaux et de la plaque de Randall ..... 193**
a) KS 3 : un prototype pour les études par DNP CP MAS ..... 193
b) Etude d'une *unique* plaque de Randall par RMN DNP CP MAS ..... 195

**4. Conclusion ..... 199**

# Chapitre 4: RMN et DNP multinucléaire appliquées aux calcifications pathologiques : calculs rénaux et plaque de Randall

Il existe de très nombreuses publications dans la littérature ayant pour objet l'analyse physico-chimique des calculs rénaux et des calcifications pathologiques (au sens large). Généralement, elles présentent les résultats de techniques couramment utilisées dans les hôpitaux, à savoir la spectroscopie FTIR, la microimagerie FTIR, la diffusion Raman, la DRX sur poudre et l'imagerie MEB. Nous mentionnons également de nouvelles contributions mettant en œuvre le rayonnement synchrotron : microdiffraction, microimagerie, EXAFS, UV… [1], [2].

La RMN en phase solide a été curieusement très peu développée et uniquement dans le milieu académique [3], [4]. Nous noterons que la première étude systématique de calculs rénaux est due à Bak *et coll.* [5]. Cette contribution a déjà été mentionnée dans le Chapitre 1, dans le cadre de la caractérisation d'échantillons synthétiques d'oxalates de calcium. Les auteurs ont étudié une large gamme de calculs rénaux. Ils démontrent qu'il est possible d'analyser ceux-ci en détails en jouant sur les méthodes de RMN 1D (*Single Pulse Experiment* et *Cross Polarization* CP), ainsi que sur les noyaux analysés ($^{31}$P, $^{13}$C). Par exemple, en modifiant le temps de contact ($\tau_{CP}$) lors de la polarisation croisée, ils déterminent les constituants principaux du matériau analysé (organique/inorganique) et l'état physique de celui-ci (cristallin/amorphe). De plus, en utilisant la rotation MAS à basse fréquence, ils analysent les environnements locaux des sites $^{31}$P grâce à l'analyse des bandes de rotation dues au CSA $^{31}$P. Clairement, cet article montre qu'il est possible et utile de développer de nouvelles méthodes de RMN et de DNP (expériences 2D, utilisation de très hauts champs magnétiques, DNP CP MAS), afin de faire progresser la description structurale des calcifications pathologiques.

Dans ce Chapitre, nous mettons à profit les acquis concernant les phases synthétiques de phosphates et d'oxalates de calcium (Chapitres 1 et 3). Plusieurs calculs rénaux (certains d'entre eux possédant une plaque de Randall) nous ont été fournis par le Dr M. Daudon et le Pr E. Letavernier de l'hôpital Tenon de Paris. Dans un premier temps, nous avons étudié les échantillons de manière systématique par FTIR et DRX sur poudre, à l'image de qui est couramment fait en milieu hospitalier. Des informations précieuses seront obtenues, concernant la nature chimique des phases minérales (COM, COD, plaque de Randall) et organiques (protéines, triglycérides, acides gras) en présence. Des informations relatives à la cristallinité des différentes phases seront obtenues également. Nous rappelons que les calculs rénaux peuvent être considérés comme des nano-composites hybrides organiques-inorganiques. Il en résulte une hétérogénéité intrinsèque qu'il faudra garder à l'esprit, en particulier lors des expériences de DNP CP MAS. La formation des calculs rénaux est très dépendante du régime alimentaire du patient et de son profil génétique. Cela conduit à une très grande variété physico-chimique. Au sein d'un même calcul, une architecture spécifique se développe "mêlant" intimement les phases minérales (cristaux micrométriques ou submicrométriques) à une matrice de type organique. Cette dernière peut tout à fait s'"incorporer" dans le calcul (voir Chapitre 5) conduisant à une inhomogénéité structurale importante.

A notre avis, la RMN en phase solide est actuellement peu développée en milieu hospitalier du fait, certes, du coût global de l'équipement, mais également du fait d'un manque de transfert de

connaissances des chercheurs académiques vers les praticiens hospitaliers. Nous pensons que les résultats présentés ci-dessous ouvriront de nouvelles pistes de recherche.

## 1. Caractérisations usuelles des calculs rénaux

Nous présentons ici les analyses effectuées sur plusieurs calculs rénaux (que nous noterons *KS x* par la suite, pour *kydney stone*) fournis par les praticiens de l'hôpital Tenon. Les résultats concerneront essentiellement 6 calculs rénaux, ainsi qu'une plaque de Randall (extraite au préalable d'un calcul par un médecin). Bien entendu, il n'a pas été question d'entreprendre une étude exhaustive des calculs : la collection du Dr M. Daudon à l'hôpital Tenon comporte plusieurs dizaines de milliers d'échantillons (!) venant du monde entier… Il en résulte de fait que les résultats présentés dans la suite de ce Chapitre n'auront pas de bases statistiques établies. Le choix des calculs étudiés a été dicté par la *présence majoritaire* d'un des constituants suivants (établie par exemple par FTIR et/ou par des images MEB et une étude approfondie de la morphologie) : COM, COD, matrice organique, présence avérée d'une plaque de Randall. Nous rappelons ici que les résultats présentés dans le Chapitre 3 nous seront d'une grande utilité (par exemple le protocole de DNP CP MAS mis en place).

### a) La spectroscopie FTIR : un outil courant de diagnostic médical

Pour analyser le spectre FTIR d'un calcul rénal, les médecins s'appuient couramment sur une base de données de spectres de différents composés, dits "*majoritaire en une certaine phase*" (par exemple COM). Les données des spectres de phases pures synthétiques ne sont pas nécessairement utiles car des différences spectroscopiques existent entre échantillons naturels et synthétiques. Tout le travail consiste alors à reconstituer le spectre initial à l'aide des spectres de références (des composés *naturels* et non pas synthétiques) de la base de données. Cette approche est rapide et simple à mettre en œuvre : elle est très développée en milieu hospitalier. Elle présente néanmoins des écueils : la base de données peut ne pas être complète, la quantification des espèces en présence peut s'avérer être délicate, l'analyse mathématique des spectres peut nécessiter l'utilisation de dérivées ou de dérivées secondes pour améliorer la précision de l'analyse… Certains points ont été abordés d'un point de vue mathématique par R. Arnaud, au cours d'un stage postdoctoral au laboratoire en collaboration avec le Dr. D. Bazin et Dr. M. Daudon.

Les spectres présentés Figure 4-1 ont été enregistrés à l'aide d'un module ATR (voir Chapitre 1).

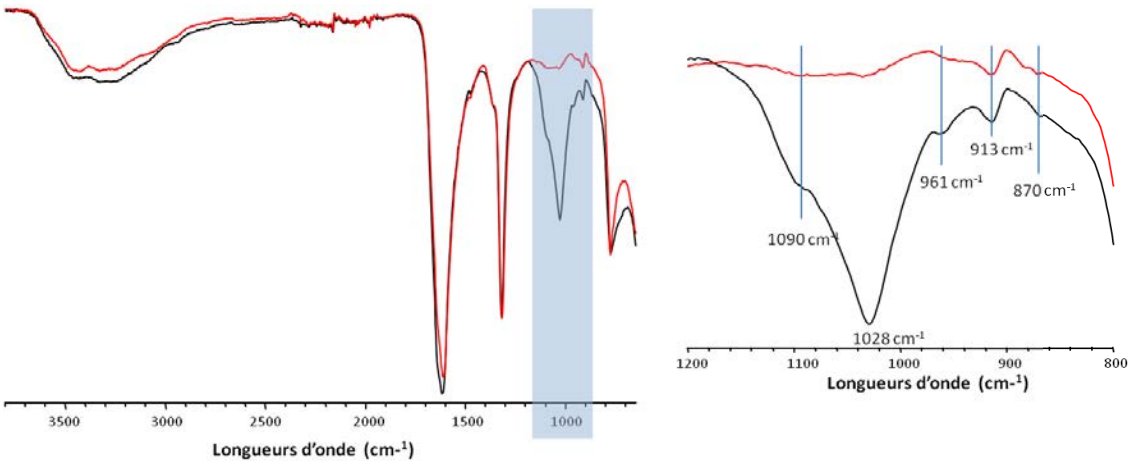



Figure 4-1 : Spectres FTIR (ATR) de deux calculs rénaux : KS 1 (en rouge) et KS 2 (en noir).

A l'aide des résultats obtenus sur les phases synthétiques de COM et de COD, on remarque que ces deux calculs contiennent un mélange de type COM/COD. La région des $\nu_{(OH)}$ (3800-2700 $cm^{-1}$) présente la superposition des cinq signaux relatifs au COM et du signal large attribué au COD. De plus, le signal caractéristique à 913 $cm^{-1}$ atteste de la présence du COD alors que les deux signaux à 961 et 870 $cm^{-1}$ montrent celle du COM. Nous remarquons qu'il est très difficile d'essayer de quantifier les proportions relatives de COM et de COD. La zone d'intérêt de 965 à 850 $cm^{-1}$ est en effet très peu intense. Une plus grande structuration du massif des $\nu_{(OH)}$ (3800-2700 $cm^{-1}$) tendrait à prouver que le COM est majoritaire dans KS 1 … mais cela reste à confirmer. La différence majeure réside dans la région entre 1200 et 900 $cm^{-1}$. Cette région correspond à des vibrations caractéristiques de groupements phosphates.

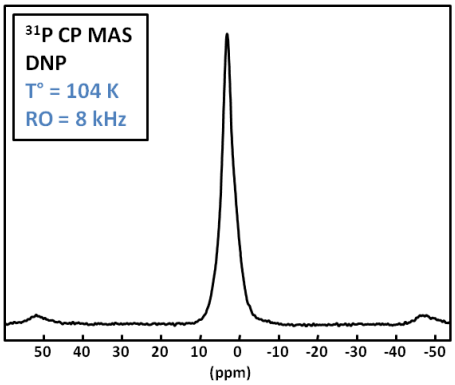



Figure 4-2 : Spectre $^{31}$P CPMAS DNP du calcul KS 2.

Comme le montre la Figure 4-2, la présence de phosphates peut être aisément confirmée par une expérience $^{31}$P RMN (ici DNP). L'étude de ces phosphates est développée dans la suite de ce chapitre.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté d'analyser les échantillons KS 1 et KS 2 par diffusion Raman. Rappelons que nous utiliserons cette technique pour caractériser des cristaux de COM et de COD synthétiques obtenus dans un montage microfluidique (voir Chapitre 5). Ici, dans le cas des calculs rénaux, nous nous sommes heurtés au problème de fluorescence. Le signal de fluorescence couvrant la gamme spectrale d'intérêt, il n'a pas été possible d'obtenir d'informations complémentaires par cette technique. La fluorescence est essentiellement due à la présence d'une matrice organique dispersée dans l'échantillon.

### b) Diffraction des rayons X sur poudre

En ce qui concerne les analyses par diffraction des rayons X sur des calculs rénaux, on peut citer les travaux récents de Bazin *et coll.* [1], ceux de Kontoyannis *et coll.* [6], ainsi que ceux d'Uvarov *et coll.* [7] et Orlando *et coll.* [8]. Cette méthode, *a priori* simple à mettre en œuvre, présente ici quelques difficultés : ***(i)*** tout d'abord, il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante d'échantillon lorsqu'on veut pouvoir travailler en géométrie classique : ceci n'est pas toujours le cas, ***(ii)*** il faut tenir compte de l'hétérogénéité de composition et de texture des échantillons, ***(iii)*** les phases amorphes éventuellement présentes (voir Chapitre 1) sont totalement sous-estimées. Les avantages majeurs sont : la mise en évidence des phases minérales, pour peu que les domaines de cohérence soient suffisamment étendus, et des informations sur le degré de cristallinité.

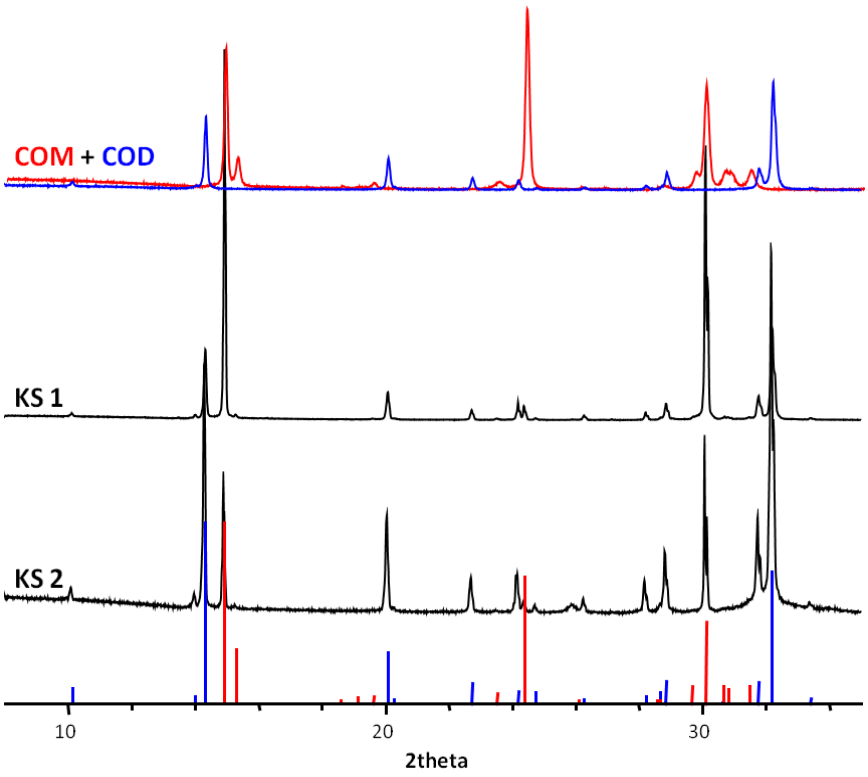



**Figure 4-3 : Diffractogrammes de deux calculs rénaux, KS 1 et KS 2. Les données JCPDS sont en rouge pour le COM et en bleu pour le COD. Les diffractogrammes en haut sont ceux de COM et COD synthétiques.**

Les calculs rénaux analysés sont formés de phases cristallines de COM et de COD. Toutes les raies de diffraction peuvent être attribuées à l'une ou l'autre de ces phases ; on remarque que certaines raies de diffraction sont sous exprimées (celle à ~ 24° en 2 thêta pour COM par exemple). Cela montre bien la différence de cristallinité et d'expression des différentes faces des cristaux entre les échantillons synthétiques et naturels. La Figure 4-3 permet de corroborer les conclusions des spectres IR : ***(i)*** les deux calculs sont bien des mélanges de COM et de COD, ***(ii)*** KS 1 est majoritairement constitué de COM, contrairement à KS 2. Une fois encore, une quantification directe des phases n'est pas évidente (mais peut néanmoins être mise en place). Nous rappelons que d'éventuelles composantes amorphes ne seraient que très mal détectées par cette technique.

## 2. Les méthodes de RMN appliquées aux calculs rénaux

Après avoir décrit les caractérisations par RMN des phases synthétiques de COM, COT, COT et CHAp (Chapitre 3), nous pouvons appliquer les expériences à des échantillons naturels provenant du milieu hospitalier. Comme expliqué précédemment, la RMN n'est pas actuellement une technique de prédilection pour analyser les calculs rénaux et conduire à un diagnostic médical. Elle propose néanmoins de nombreuses pistes d'étude, que ce soit en termes de noyaux sondés ($^{1}$H, $^{13}$C, $^{43}$Ca, $^{29}$Si, $^{27}$Al (!)…) ou en termes de méthodologie (séquences d'impulsions, DNP CP MAS…).

### a) Caractérisation des phases par RMN $^{1}$H, $^{13}$C, $^{43}$Ca, $^{29}$Si et $^{27}$Al

L'analyse des spectres de calculs rénaux s'appuie sur les signatures spectroscopiques obtenues pour les phases synthétiques et présentées dans le Chapitre 3. Nous verrons qu'il est possible de mettre en place des protocoles d'analyse en vue d'obtenir des résultats quantitatifs.

### i. $^{1}$H DUMBO MAS (CRAMPS), écho de Hahn et DQF COSY

Nous présentons ici les résultats $^{1}$H MAS enregistrés à haut champ magnétique (700 MHz) et en présence de découplage homonucléaire DUMBO (Chapitre 2). Nous avons montré dans le cas de COM, COD et COT qu'un tel découplage homonucléaire était absolument nécessaire pour obtenir une résolution spectrale suffisante (Chapitre 3 partie 1 a).i.). En effet, la séquence DUMBO supprime efficacement les couplages dipolaires homonucléaires présents au sein du réseau de liaisons–H établi par les molécules d'eau présentes dans les structures. La Figure 4-4 propose une comparaison entre les spectres de calculs rénaux (KS 1, 2 et 3) et les phases COM, COD et COT synthétiques. Le calcul KS 3 se distingue nettement de KS 1 et KS 2. En effet, il contient : ***(i)*** une phase COM "*majoritaire*" et l'absence de COD, ***(ii)*** une grande quantité de phase organique, ***(iii)*** une phase de silice amorphe, dite "*opaline*" (nous reviendrons sur l'origine probable d'une telle silice amorphe lorsque nous présenterons les spectres $^{29}$Si CP MAS). Les points ***(i)***, ***(ii)*** et ***(iii)*** ont été déduits d'étude préalables par FTIR et MEB. La température est maintenue à 10°C à l'aide du module BCUX, de façon à minimiser les transformations de phases *in situ* (voir Chapitre 3).

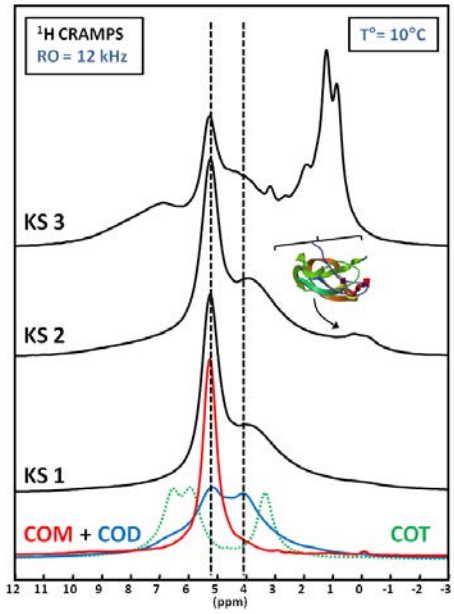



**Figure 4-4 : Spectres $^{1}$H CRAMPS de trois calculs rénaux (KS 1, KS 2 et KS 3). Les spectres $^{1}$H CRAMPS du COM (en rouge), du COD (en bleu) et du COT (en vert) synthétiques sont rappelés. Le schéma de protéine indique la présence de résonances dues à la matrice organique dans les calculs KS 2 et KS 3. Sonde MAS 2,5 mm, 700 MHz.**

Comme dans le cas des phases synthétiques, les spectres sont enregistrés en quelques dizaines de secondes. Il s'agit donc d'une méthode très rapide et simple à mettre en œuvre : il est même possible d'optimiser les paramètres de la séquence DUMBO pour chaque échantillon. On peut néanmoins se poser la question de la quantification de tels spectres. La simulation des spectres de KS 1 et KS 2 est présentée sur la Figure 4-5. A partir des spectres des phases synthétiques, des modèles (rouge et bleu) ont été utilisés pour rendre compte de la présence de COM et COD, respectivement. Nous avons conservé les largeurs de raie des différentes composantes et les déplacements chimiques isotropes et seules les intensités ont été optimisées.

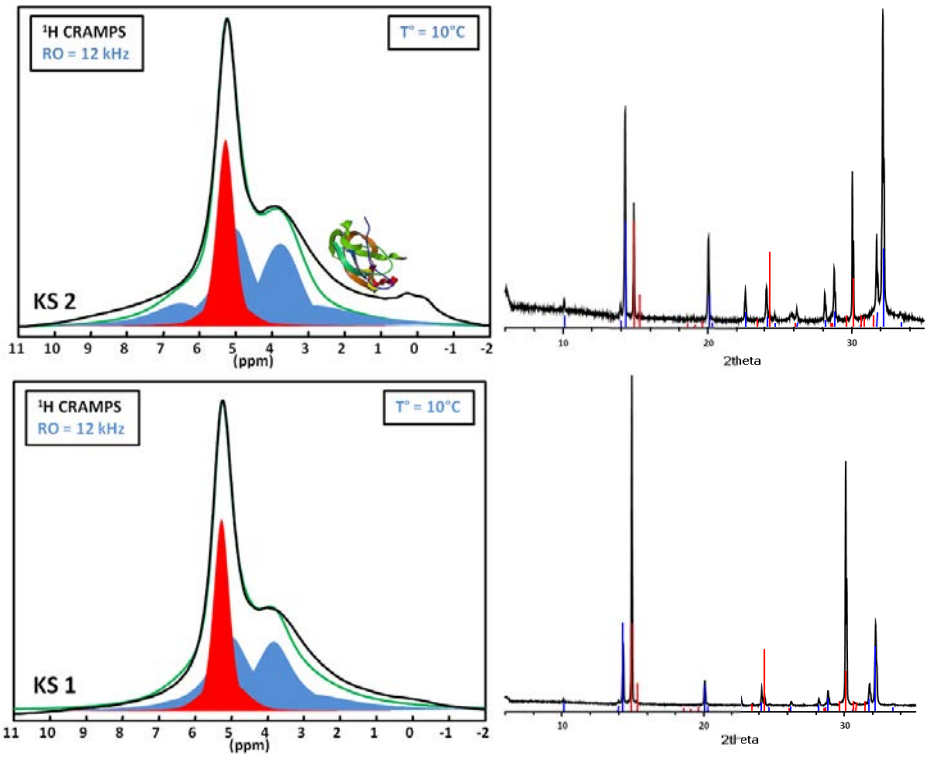



**Figure 4-5 : Simulation des spectres $^{1}$H CRAMPS de KS 1 et KS 2. En rouge : COM. En bleu : COD. En vert : somme. Les diffractogrammes sont rappelés pour comparaison. Sonde MAS 2,5 mm, 700 MHz.**

L'accord est loin d'être satisfaisant, en particulier pour KS 2. L'intégration des deux composantes conduit à COM/COD ~ 1 pour KS 1 *et* KS 2, ce qui semble contradictoire avec les résultats de FTIR et de DRX sur poudre. Le désaccord est probablement dû à deux sources distinctes : ***(i)*** la présence probable d'une composante organique, en particulier pour KS 2 (Figure 4-5) qui complique l'analyse. Les résonances de la matrice organique sont particulièrement visibles dans le cas de KS 3 (voir le schéma indicatif de protéines), ***(ii)*** un élargissement intrinsèque des signaux du COM et du COD dû à des distributions de déplacements chimiques $^{1}$H au sein des nanocomposites.

A ce stade, l'analyse $^{1}$H MAS CRAMPS est prometteuse quant à la quantification des phases présentes mais elle reste délicate. En d'autres termes, "*il manque encore un peu de résolution spectrale $^{1}$H*" pour pouvoir proposer un protocole de quantification précis et fiable. Des expériences à ultra haut champ magnétique (1 GHz), en rotation ultra-fast MAS et en combinant des séquences de découplage homonucléaires pourraient être intéressantes de ce point de vue.

A 700 MHz, nous mentionnons qu'il est possible (d'un certain point de vue) d'accroître la résolution $^{1}$H en utilisant la séquence d'écho de Hahn synchronisée ave la rotation MAS, pour des délais de refocalisation ($\tau$) longs (jusqu'à plusieurs ms). La Figure 4-6 présente des spectres $^{1}$H obtenus à $\tau$ variable dans le cas de KS 3.

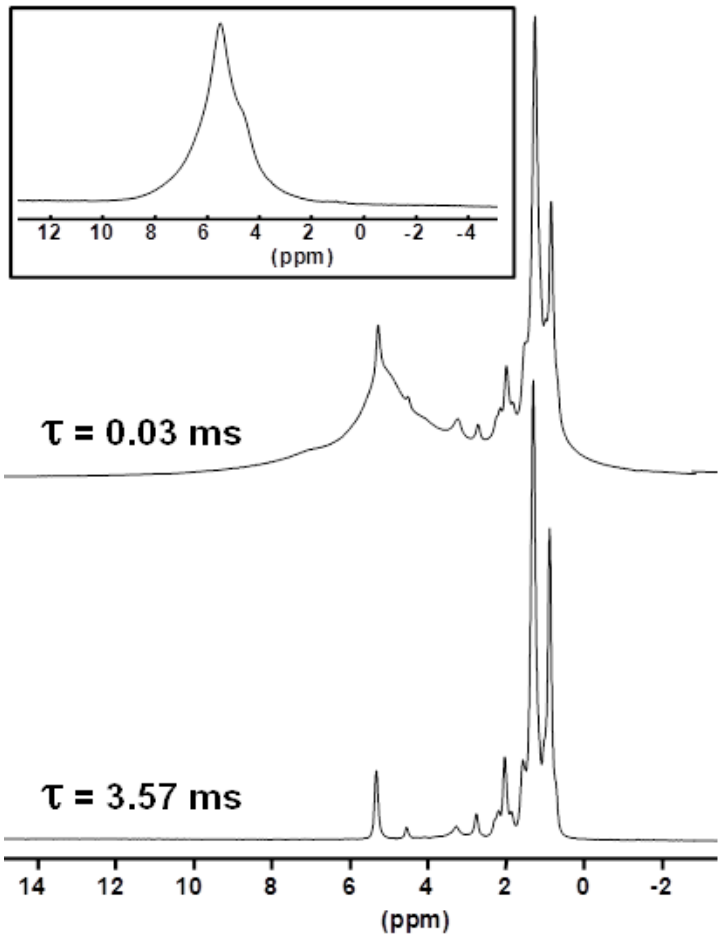



**Figure 4-6 : Echos de Hahn $^{1}$H MAS à temps de refocalisation (τ) variable dans le cas du calcul rénal KS 3. τ est synchronisé avec la fréquence de rotation MAS (ici 30 kHz). Sonde MAS 2,5 mm, 700 MHz. NS = 64, délai de relaxation $^{1}$H : 5 s. Insert : spectre obtenu dans les mêmes conditions pour la phase COM synthétique.**

Nous notons tout d'abord que la résolution n'est pas identique à celle de la Figure 4-4. En effet, nous comptons ici uniquement sur l'effet de la rotation MAS à très haute fréquence (30 kHz). La température n'a pas été régulée ici, alors qu'il aurait été intéressant de le faire (voir Chapitre 3). Pour la valeur la plus élevée de τ, des résonances fines sont obtenues. Elles correspondent à des composantes mobiles. Les déplacements chimiques isotropes $^{1}$H observés sont en accord avec ceux d'*acides gras* présentant des insaturations (cf. $\delta_{iso}(^{1}H) \sim 5{,}25$ ppm) [9]–[11]. *A priori*, nous excluons la présence de triglycérides, les résonances C<u>H</u> et C<u>H$_2$</u> (~ 4,2 et 5,2 ppm) du squelette glycérol n'étant pas clairement détectées.

Compte tenu de la mobilité de ces composantes, il est tout à fait possible de mettre en place des expériences dérivées de la RMN en solution (homonucléaires comme $^{1}$H–$^{1}$H DQF COSY, ou hétéronucléaires, comme $^{1}$H–$^{13}$C INEPT) et la rotation rapide MAS. Dans ces conditions, seule la partie isotrope de l'interaction de couplage $J_{1H\text{-}1H}$ intervient. Sur le Figure 4-7, nous présentons l'expérience $^{1}$H–$^{1}$H DQF COSY MAS appliquée au composé KS 3.

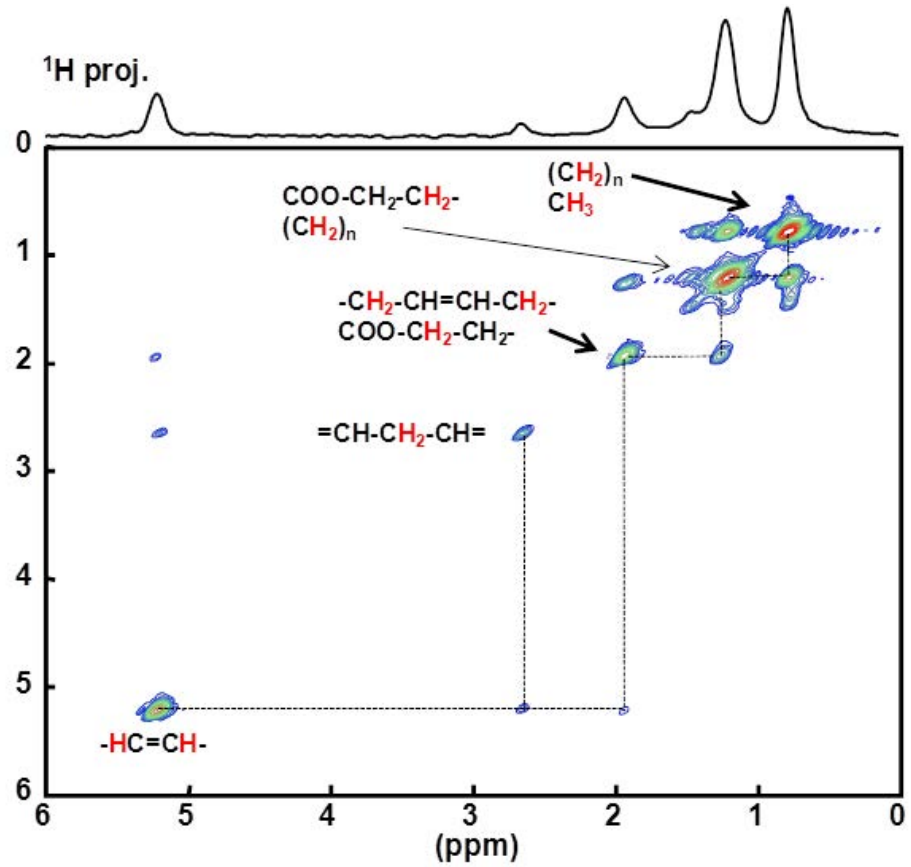



**Figure 4-7 : Expérience $^1$H–$^1$H DQF COSY MAS (30 kHz), 700 MHz, sonde MAS 2,5 mm. Délai de relaxation $^1$H : 2 s, NS = 32, incréments dans la dimension $t_1$ : 256, représentation en mode magnitude.**

En observant de manière détaillée les différentes tâches de corrélation, il est possible d'interpréter la totalité des signaux $^1$H (voir Figure 4-7). Bien que la RMN $^1$H (CRAMPS, écho de Hahn, séquences fondées sur l'interaction J) soit adéquate pour l'étude de la composition des KS, il nous est apparu important de mettre en place différentes expériences $^{13}$C, le but étant de simplifier les spectres obtenus par des méthodes *d'édition spectrale*.

### *ii. $^{13}$C CP MAS et $^1$H–$^{13}$C INEPT MAS*

Nous rappelons ici très brièvement les caractéristiques $^{13}$C en rotation MAS des différentes phases synthétiques d'oxalate de calcium hydraté (voir Chapitre 3) : *COM* : 4 résonances isotropes ; *COD* : 1 résonance isotrope unique (élargie) ; *COT* : 2 résonances isotropes. La gamme des déplacements chimiques est particulièrement restreinte, de 167 à 172 ppm environ.

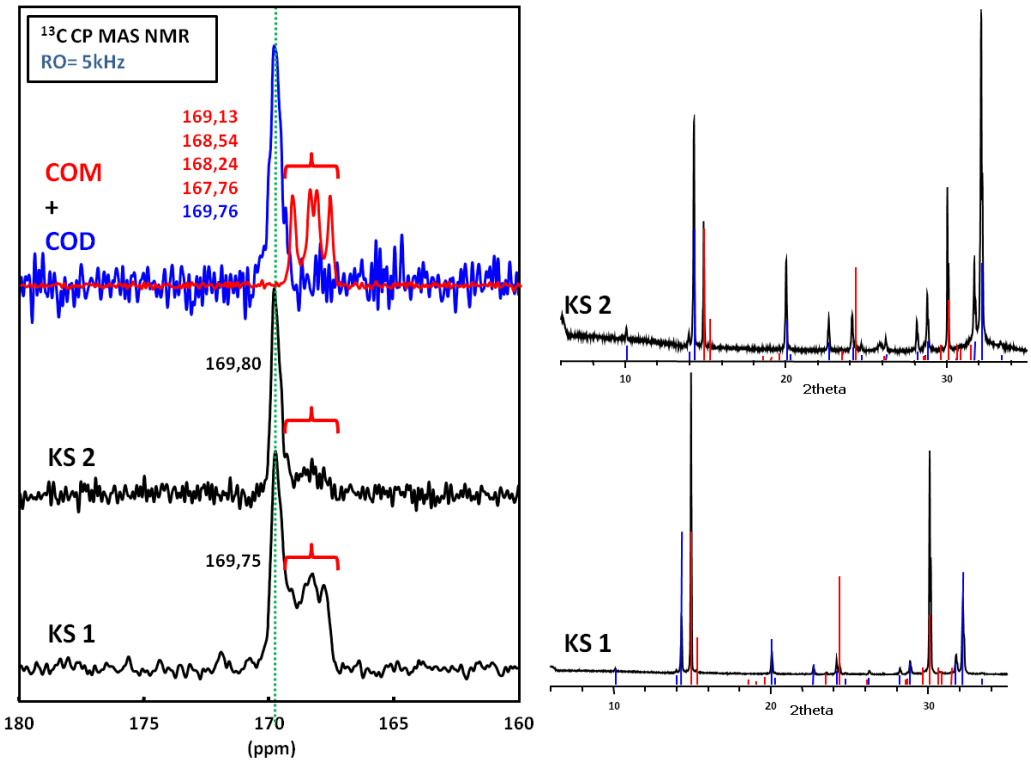



**Figure 4-8 : Spectres $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ CP MAS des deux calculs rénaux, KS 1 et KS 2 avec leur diffractogramme respectif. Les spectres du COM (en rouge) et du COD (en bleu) synthétiques sont rappelés également. Sonde MAS 2,5 mm, 700 MHz.**

Les spectres $^{13}$CP MAS des composés KS 1 et KS 2 sont présentés sur la Figure 4-8. La distinction entre COM et COD est très bien mise en évidence. La quantification des deux phases est envisageable et ce, même en choisissant un seul temps de contact. En effet, les noyaux $^{13}$C impliqués dans COM et COT sont tous de type acide carboxylique en interaction de type liaisons-H avec des molécules d'eau. Si nécessaire, une courbe complète à temps de contact variable pourrait être enregistrée. L'avantage de la RMN $^{13}$C CP MAS par rapport à le DRX sur poudre est que cette dernière n'est pas sensible aux phases désordonnées voire amorphes. Or, nous avons vu au cours du Chapitre 3 que la phase COM pouvait être caractérisée par des spectres $^{13}$C légèrement différents, ces différences n'étant pas clairement détectées par DRX.

### *iii. $^{43}$Ca MAS*

Les calculs rénaux ont été broyés afin d'être analysés par RMN à très haut champ (20 T, 850 MHz, fréquence MAS de 3 kHz). Les rotors utilisés ici ont un diamètre de 7 mm pour des raisons de sensibilité évoquées dans le Chapitre 2.

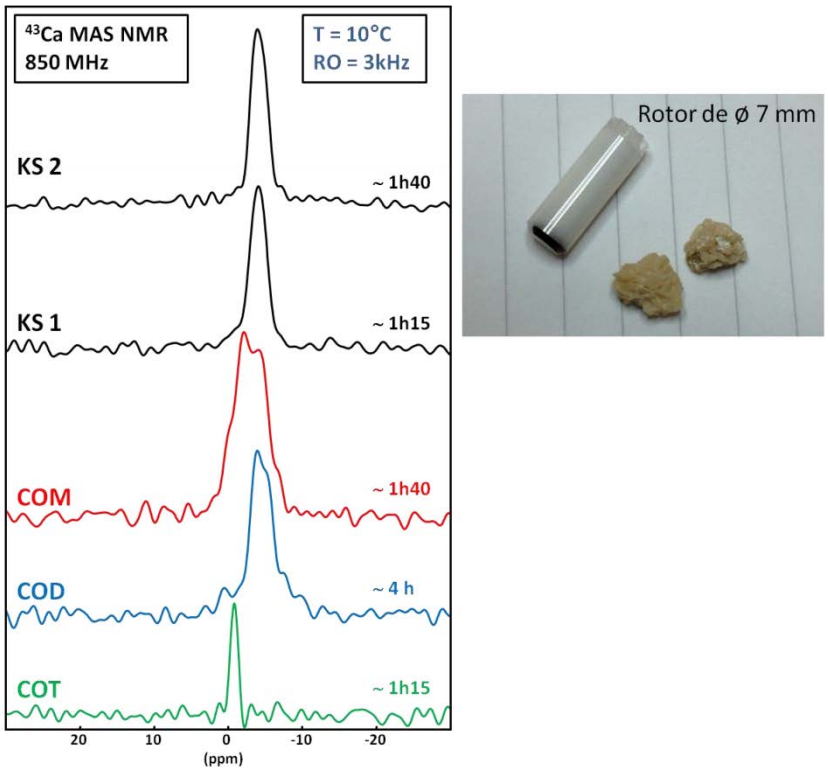



**Figure 4-9 : Spectres $^{43}$Ca MAS des deux calculs rénaux, KS 1 et KS 2. Les spectres du COM (en rouge), du COD (en bleu) et du COT (en vert) synthétiques sont présentés pour comparaison. Sonde MAS 7 mm, 850 MHz.**

La Figure 4-9 présente les spectres $^{43}$Ca de KS 1 et KS 2. Contrairement aux spectres précédents ($^{1}$H et $^{13}$C), il est cette fois ci délicat de distinguer les contributions du COM et du COD. Les résonances présentent une allure gaussienne, compatible avec les déplacements chimiques du COM et du COD synthétiques. Cette allure gaussienne ne correspond pas à une distribution de paramètres quadripolaires mais plutôt à une légère distribution de déplacements chimiques. Colas *et coll.* [12] ont montré à l'aide de calculs GIPAW (voir Chapitre 2) que $\delta_{iso}(^{43}Ca)_{calc}$ était particulièrement sensible à de subtiles variations locales du polyèdre de coordination de l'ion calcium. En conclusion, les différents environnements chimiques ne sont pas clairement distingués par RMN $^{43}$Ca MAS dans le cas des KS.

Avant de clore ce paragraphe, nous revenons sur la contribution de Bowers *et coll.* [13] concernant la caractérisation de calculs rénaux par RMN $^{43}$Ca. La largeur de raie observée (~ 15 ppm, spectromètre 900 MHz) est interprétée en terme de distributions d'environnements des atomes de calcium au niveau d'une interface organique-inorganique (faisant intervenir des fonctions carboxyliques organiques). Les largeurs de raie mesurées pour KS 1 et KS 2 sont beaucoup plus faibles ce qui tend à démontrer que cette largeur de raie est porteuse d'informations structurales (certes difficiles à déterminer). Bowers *et coll*. montrent également un décalage global de la raie $^{43}$Ca du calcul rénal par rapport aux phases de référence (COM, COD et COT) qu'ils attribuent de nouveau à la nature hybride organique-inorganique de l'architecture. Nous n'observons pas un tel effet. Nous soupçonnons que le décalage observé par les auteurs soit dû à une erreur de référence de l'axe $^{43}$Ca, celui-ci ayant été effectué à l'aide s'une solution aqueuse "saturée" de $CaCl_2$, et non pas à l'aide d'une solution de titre 1,0 mol.L$^{-1}$ [14].

### iv. *$^{29}$Si et $^{27}$Al : l'exemple de KS 3*

L'échantillon KS 3 est particulier à double titre. Tout d'abord, il contient une large part de matrice organique (voir Figure 4-4 ci-dessus). De plus, il présente une quantité non négligeable de silice amorphe (les praticiens hospitaliers parlent de silice "*opaline*"). La silice est très bien mise en évidence par RMN $^{29}$Si MAS (Figure 4-10).

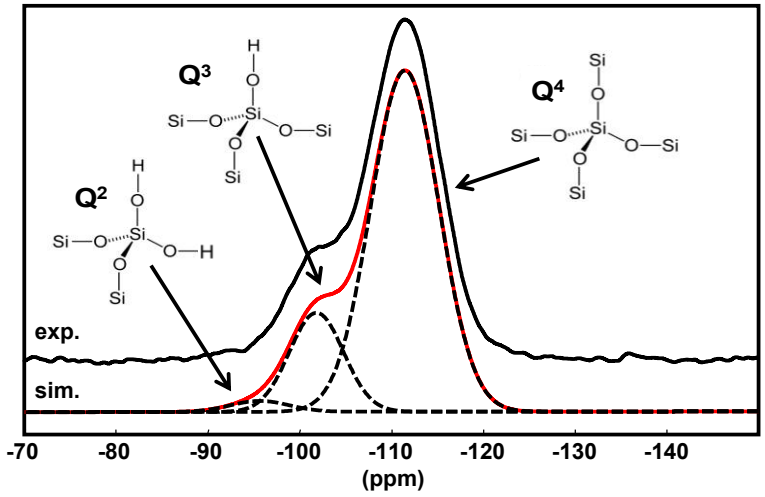



**Figure 4-10 : Spectre $^{29}$Si MAS du calcul rénal KS 3. La simulation du spectre fait intervenir des entités $Q^4$ et $Q^3$ (majoritaires) et $Q^2$ (très minoritaires). 7,0 T, 300 MHz. Rotation MAS : 5 kHz, sonde 7mm. Découplage {$^1$H} de type SPINAL-64** [15], [16]**. Délai de relaxation : 600 s. NS = 248 (environ 41 heures).**

Le spectre $^{29}$Si MAS est facilement interprété en termes d'entités $Q^2$, $Q^3$ et $Q^4$ ($Q^2$: $Si(OH)_2(OSi)_2$, $Q^3$: $Si(OH)(OSi)_3$, $Q^3$: $Si(OSi)_4$ [17]**)**. Ce spectre est effectivement comparable à celui obtenu pour des opales naturelles [18]. Les temps de relaxation $T_1$($^{29}$Si) ont été mesurés pour les unités ($Q^2$ + $Q^3$) et $Q^4$ par saturation-récupération. Les courbes ont été simulées à l'aide d'exponentielles étirées (*stretched exponentials*) comme suggéré par Stebbins *et coll.* dans des travaux récents [19], [20]. A partir de la simulation des courbes, nous obtenons $Q^4/(Q^2+Q^3)$ = 86/14 alors qu'expérimentalement, ce rapport vaut 79/21. En d'autres termes, le délai de relaxation utilisé ici (*i.e.* 600 s) n'est pas suffisant pour atteindre la relaxation des unités $Q^4$. Nous avons été assez étonnés par un tel résultat, qui démontre l'absence d'agents relaxants (comme par exemple des ions paramagnétiques) au sein des sphères de silice amorphe naturelle. Plusieurs calculs rénaux ont donné de tels spectres $^{29}$Si MAS. De fait, les échantillons proviennent de patients du Burkina Faso. On soupçonne que l'origine de la silice « *opaline* » soit de type alimentaire : en effet, l'argile en petite quantité fait partie intégrante de l'alimentation au Burkina Faso. Nous avons confirmé cette hypothèse en enregistrant un spectre $^{27}$Al MAS à partir de l'échantillon KS 3 (Figure 4-11). La présence d'aluminium est avérée mais en très faible quantité. En effet, le temps d'acquisition du spectre est de l'ordre de ~ 12 heures.

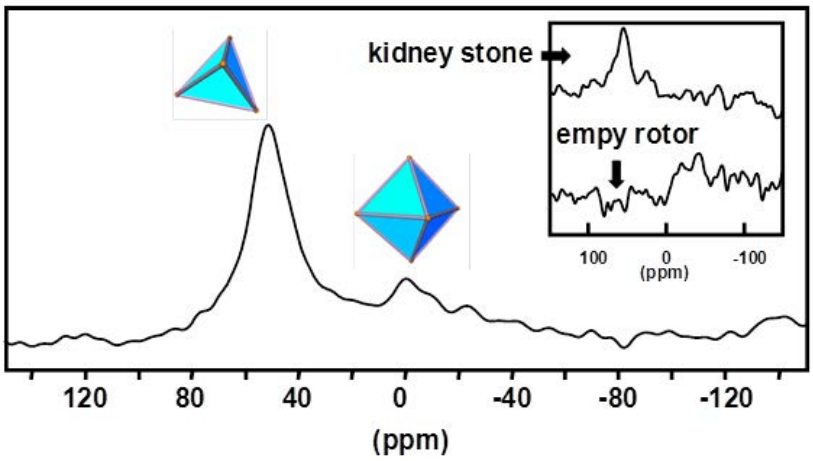



**Figure 4-11 : Spectre $^{27}$Al MAS du calcul rénal KS 3. Rotation MAS : 5 kHz, sonde 7mm. 7,0 T, 300 MHz. Temps d'expérience : environ 12 heures. Les zones caractéristiques des atomes Al en coordinence 4 et 6 sont indiquées. Insert : spectres d'un rotor vide en rotation et de l'échantillon KS 3 (2 heures). Ce test permet d'éliminer une contribution potentielle du rotor dans le spectre de KS 3.**

Une majorité de sites $^{27}$Al correspond à des atomes d'aluminium en coordinence 4 (ou éventuellement 5) ($\delta \approx 55$ ppm). Un signal beaucoup plus faible centré sur $\delta \approx 0$ ppm est partiellement attribué à une contribution du rotor. Signalons qu'un tel spectre $^{27}$Al MAS a déjà été obtenu par Klinowski *et coll.* [21] dans le cas d'une « opale » d'origine végétale (1 à 2 % en poids en aluminium). Pour conclure ce paragraphe, il est évident que la méthode QCPMG pourrait conduire à une acquisition beaucoup plus rapide d'un tel spectre [22].

### b) Etude par RMN de la matrice organique : échantillon KS 3

Dans cette section, nous focalisons notre attention sur l'étude par RMN $^{13}$C de la matrice organique présente dans les calculs rénaux (certains résultats par RMN $^{1}$H ont été présentés ci-dessus). Cette matrice organique peut contenir des lipides, des triglycérides, des constituants membranaires, des glycoprotéines (comme la protéine de Tamm-Horsfall) et des glycoaminoglycanes [4]. Afin de faciliter la mise en place d'un protocole cohérent d'expériences, nous avons étudié l'échantillon le plus riche en matrice organique, à savoir KS 3. Le but a été de proposer des expériences d'*édition spectrale* permettant de sélectionner séparément les différents constituants de cette matrice et de "reconstruire" le spectre $^{13}$C CP MAS initial. Nous nous appuierons sur les résultats obtenus par RMN $^{13}$C à partir des phases synthétiques d'oxalate de calcium hydraté.

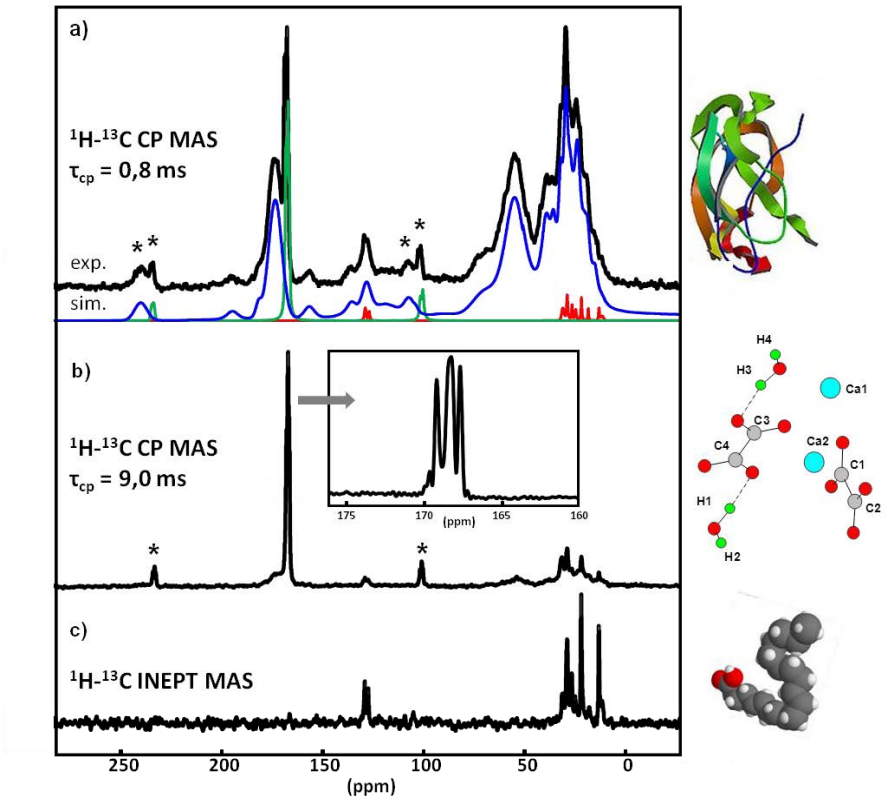



**Figure 4-12 : Spectres $^{13}$C du calcul rénal KS 3 (celui-ci contient une forte proportion de matrice organique). a) $^1$H → $^{13}$C CP MAS avec un temps de contact court de 0,8 ms. b) $^1$H → $^{13}$C CP MAS avec un temps de contact long de 9,0 ms. c) $^1$H → $^{13}$C INEPT MAS. Illustrations : protéines, oxalate de calcium monohydraté (COM) et acides gras.**

Le spectre $^1$H → $^{13}$C CP MAS de KS 3 obtenu à "court" temps de contact ($\tau_{CP}$ = 0,8 ms) est présenté sur la Figure 4-12a. Il s'agit d'un spectre complexe comportant tout à la fois des résonances fines (≈ 170 ppm et dans la région 0–50 ppm environ) et des résonances beaucoup plus larges (≈ 175 ppm, ≈ 50 ppm and ≈ 25 ppm). Nous observons ainsi la totalité du contenu carboné de KS 3 (en excluant bien sûr d'éventuelles espèces totalement déprotonées). Un premier filtre de type $T_{1\rho}(^1H)$ est effectué en augmentant (par un facteur ~ 10) le temps de contact, $\tau_{CP}$ (Figure 4-12b). Les parties larges du spectre sont totalement sous-estimées et sont donc caractérisées par des valeurs de $T_{1\rho}(^1H)$ faibles. Les 4 résonances de la phase COM sont bien mises en évidence. La phase COD est absente en accord avec les expériences préliminaires de FTIR et de DRX sur poudre. Il est intéressant de noter que les bains de protons impliqués dans le transfert CP de la phase COM et des composantes larges sont disjoints (du fait de valeurs de $T_{1\rho}(^1H)$ très différentes). Cette remarque tend à prouver que les deux composantes ne sont pas intimement « liées ». A ce stade, nous n'avons pas tenté de mettre en place des expériences de spin diffusion $^1$H–$^1$H, ni de mesurer des tailles de domaine [23]. Enfin, l'utilisation de la séquence $^1$H → $^{13}$C INEPT MAS (Figure 4-12c) permet de singulariser des composantes mobiles pour lesquelles la partie isotrope du couplage $^1J_{1H\text{-}13C}$ est dominante en rotation MAS rapide. Les sites $^{13}$C des acides gras évoqués ci-dessus dans le cadre de l'étude par la séquence $^1$H–$^1$H DQF COSY sont bien mis en évidence. Les insaturations correspondent à $\delta_{iso}(^{13}C)$ ~ 125 ppm. Une expérience 2D $^1$H–$^{13}$C INEPT MAS pourrait être envisagée pour compléter les attributions des résonances $^1$H et $^{13}$C : elle n'a pas été tentée.

Finalement, le spectre initial de la Figure 4-12a peut être reconstruit simplement à partir des composantes suivantes : ***(i)*** la phase COM, en tenant compte des 4 résonances isotropes et des

bandes de rotation (en vert sur le spectre), ***(ii)*** les acides gras caractérisés par des résonances très fines (en rouge), ***(iii)*** des protéines (dont nous ne pouvons pas spécifier la nature exacte) qui correspondent à la composante (en bleue). Cette composante est tout à fait en accord avec les données de RMN $^{13}C$ des protéines en phase solide (mais également en solution)[24].

### c) Les phosphates de "trame" : étude par RMN $^{31}P$ MAS et CP MAS

Précédemment, nous avons observé sur la Figure 4-1 (échantillon KS 2) qu'une bande infrarouge assez intense pouvait être observée dans la région 1200-900 $cm^{-1}$. Afin d'attribuer cette bande, nous avons suggéré la présence de groupements phosphates. Lors de l'étude de KS 2 par DRX sur poudre (Figure 4-3), aucun phosphate particulier (cristallisé) n'a été mis en évidence. Nous en déduisons que la quantité de phosphates est faible ou qu'ils appartiennent à des composantes désordonnées.

La question des phosphates dits de "*trame*" nous a été posée par les cliniciens de l'hôpital Tenon. La présence de phosphates est depuis longtemps suggérée par l'observation détaillée de nombreux spectres FTIR. Mais à ce jour, il est difficile d'en dire plus sur leur nature chimique exacte. Rappelons que les groupements phosphates peuvent correspondre à : ***(i)*** des phases minérales comme l'hydroxyapatite (HAp) substituée (voir Chapitre 1) ou d'autres phosphates de calcium tels que la brushite, $CaHPO_4{\cdot}2H_2O$ ou la struvite, $NH_4MgPO_4{\cdot}6H_2O$, ***(ii)*** à des phosphates organiques présents dans les phospholipides (dans la membrane cellulaire), dans l'ADN et l'ARN, et dans l'ATP [25].

Dans leur article sur les calculs rénaux, Bak *et coll*. [5] utilisent la RMN $^{31}P$ MAS et CP MAS afin de mettre en évidence les phases minérales phosphatées. Curieusement, ils mettent en évidence une certaine variabilité des déplacements chimiques isotropes $^{31}P$ en fonction de l'échantillon étudié. Ainsi, dans le cas de la struvite, $\delta_{iso}(^{31}P)$ peut varier entre $\sim$ 5,5 et $\sim$ 6,3 ppm.

Dans le cadre de l'étude des phosphates de "trame", il convient donc d'analyser plusieurs échantillons par RMN $^{31}P$ MAS et CP MAS (1D et 2D) pour tenter de valider (ou non) la présence de phosphates et le cas échéant, de les identifier, y compris dans des calculs contenant *majoritairement* les phases COM et/ou COD. Sachant que nous allons sans doute rencontrer des phases minoritaires, le noyau $^{31}P$ se prête bien à une telle étude compte tenu de sa forte sensibilité (abondance naturelle : 100 %, γ élevé). Les expériences MAS ont été effectuées à un découplage $\{^1H\}$ haute puissance de façon à améliorer la résolution (expérience HPDEC). L'expérience $^1H \rightarrow {}^{31}P$ CP MAS est utilisée ici pour mettre en évidence des connectivités spatiales entre noyaux $^1H$ et $^{31}P$, et pour minimiser les délais de relaxation (en général, $T_1(^1H) < T_1(^{31}P)$). Un total de 9 échantillons a été étudié. Pour tenter d'estimer la variabilité des phosphates de "trame", nous avons volontairement choisi des calculs contenant le COM comme phase *majoritaire*. Ceci est bien démontré par DRX sur poudre au centre de la Figure 4-13. Remarquons que la diffraction des rayons X n'est sensible qu'aux domaines cristallins de taille suffisamment grande. On remarque que tous les pics de diffraction peuvent être attribués à une unique phase cristalline, le COM. Comme nous l'avons déjà évoqué (voir Chapitres 2 et 3), la RMN $^{13}C$ est particulièrement sensible à l'ordre local. Ceci est parfaitement démontré à gauche de la Figure 4-13 : les deux spectres rendent compte d'un désordre (à l'échelle de quelques fractions de ppm !), par comparaison à un spectre de COM synthétique. On remarque de plus que ce « désordre » n'est pas identique entre KS 4 et KS 5. Les expériences $^{13}C$ CP MAS ont été effectuées à fréquence de rotation faible (5 kHz) de façon à ne pas induire de modifications structurales *in situ* (voir Chapitre 3 partie 1 b).i.).

Les spectres de RMN $^{31}$P sont présentés sur la partie droite de la Figure 4-13. Tout d'abord, on note un rapport signal/bruit moyen pour un temps d'acquisition de l'ordre de 2 à 3 heures. Compte tenu de la sensibilité du noyau $^{31}$P, ce résultat indique la présence d'une faible quantité globale de phosphates dans KS 4 et KS 5. On observe également des différences nettes entre les signatures $^{31}$P de KS 4 et KS 5. Cela démontre un avantage certain de la RMN en tant qu'outil analytique par rapport à la spectroscopie FTIR et la DRX sur poudre. Il est noté que les spectres $^{31}$P de KS 5 sont quasiment identiques à ceux de 7 autres échantillons (parmi les 9 étudiés ici).

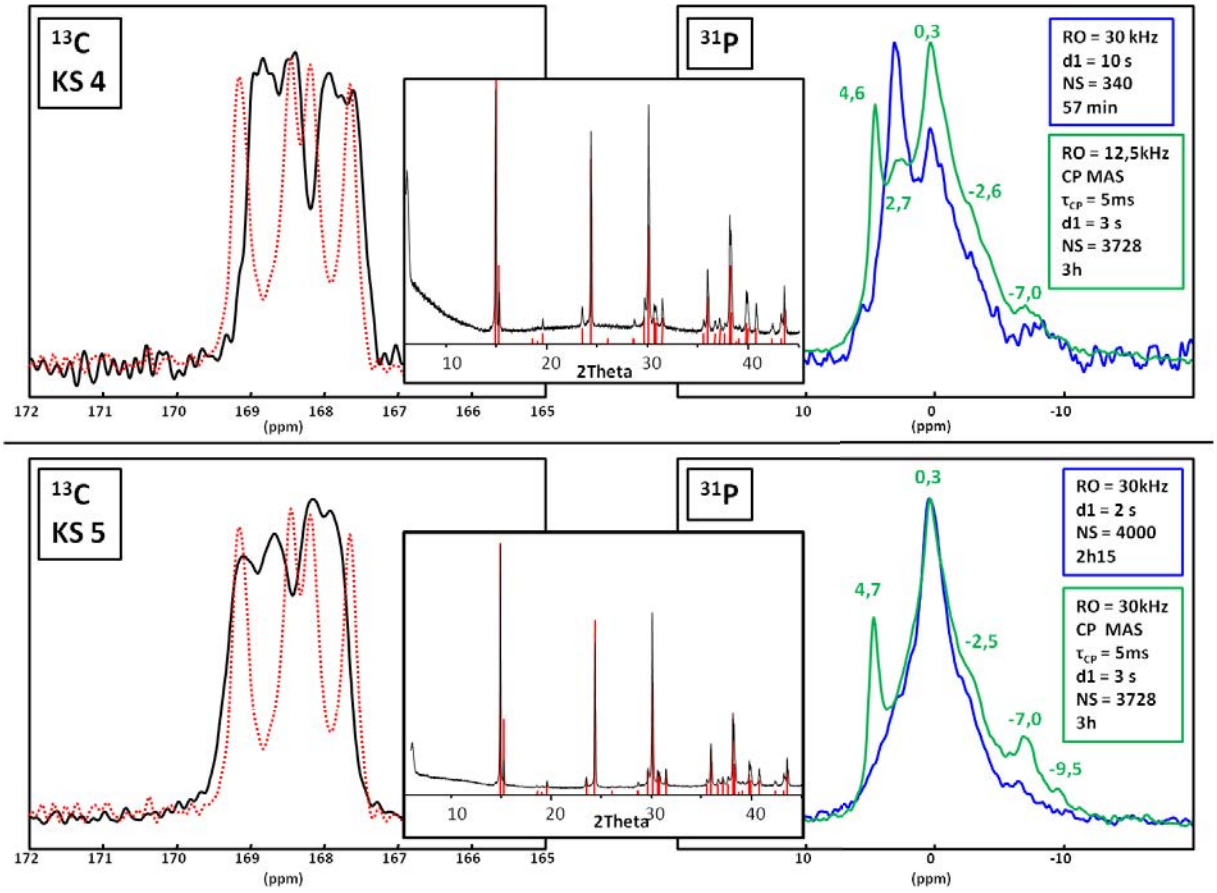



**Figure 4-13 : Spectres $^{13}$C et $^{31}$P de deux calculs rénaux, KS 4 et KS 5. A gauche : spectres $^{1}$H → $^{13}$C CP MAS de KS 4 et KS 5 (en noir) et de COM synthétique (en rouge) pour comparaison (RO = 5 kHz). A droite : spectres $^{31}$P HPDEC MAS (en bleu) et $^{1}$H → $^{31}$P CP MAS (en vert) (RO = 30 kHz, temps de contact : 5 ms). Les diffractogrammes correspondants à KS 4 et KS 5 sont présentés au centre (en rouge : les données JCPDS du COM). Les spectres sont normalisés de façon à faciliter la comparaison.**

Globalement, la largeur des raies en RMN $^{31}$P est un indice attestant du probable désordre au sein de ce(s) composé(s) phosphaté(s). Les observations principales sont les suivantes : ***(i)*** en RMN $^{31}$P HPDEC, un signal large et centré sur ~ 0,0 ppm est observé dans les deux cas. On note en outre un pic centré sur ~ 2,8 ppm représentatif du calcul KS 4 et qui pourrait être attribué à une phase de type *apatitique* sur la seule donnée du déplacement chimique isotrope $^{31}$P (nous verrons par la suite que cette hypothèse est peu probable), ***(ii)*** en RMN $^{1}$H → $^{31}$P CP MAS, les résonances à ~ 0,0 et surtout ~ 4,6 ppm sont exacerbées (alors que la résonance à ~ 2,8 ppm (KS 4) ne l'est pas), ***(iii)*** des résonances sont observées jusqu'à −10 ppm environ.

L'attribution des résonances est très délicate ici sachant que nous ne disposons que de données de RMN 1D. Néanmoins, la Figure 4-14, issue d'un article très récent [26], peut nous donner des pistes

de réflexion. Ce travail concerne l'analyse par RMN $^{31}$P (en solution) de phosphates présents en milieu biologique.

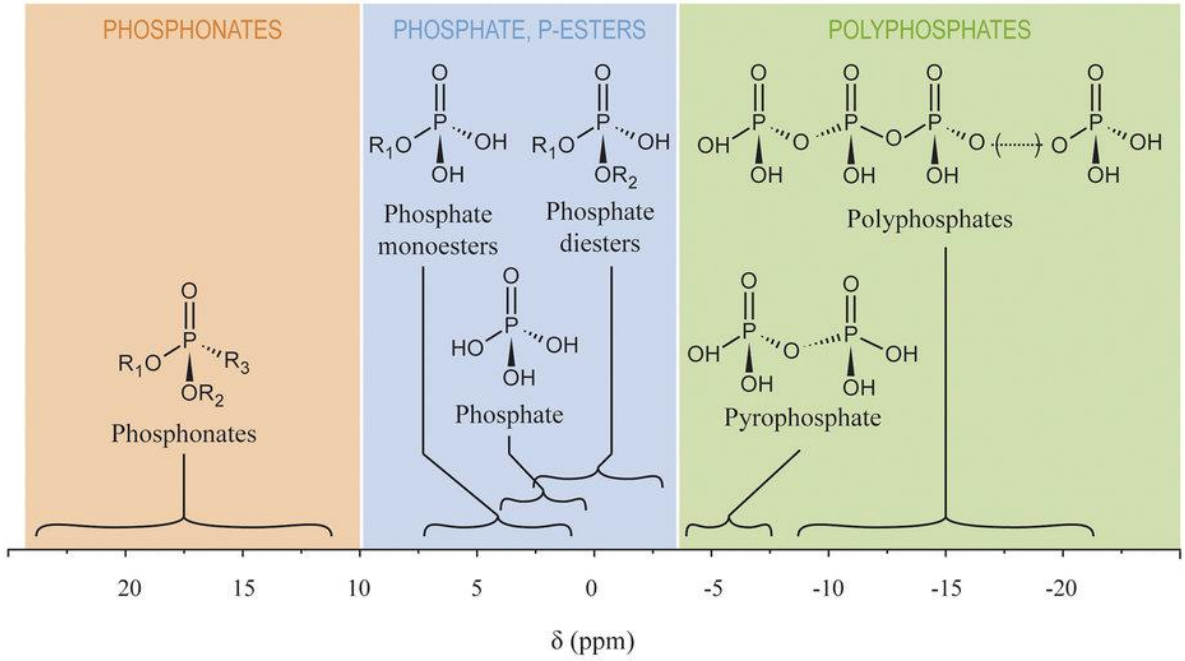



**Figure 4-14 : Gammes de déplacements chimiques isotropes $^{31}$P, d'après** [26].

Les proximités $^{1}$H–$^{31}$P n'étant pas établies, nous avons tenté d'analyser l'échantillon KS 4 par RMN 2D $^{1}$H → $^{31}$P HETCOR CP MAS (Figure 4-15). Le choix s'est porté vers KS 4 du fait de la présence des trois résonances à 4,6 ; 2,7 ; 0,3 ppm en RMN $^{31}$P CP MAS (voir Figure 4-13). Dans un premier temps, nous avons utilisé le temps de contact le plus court possible ($\tau_{CP}$ = 0,5 ms), de façon à favoriser les connectivités proches entre noyaux $^{1}$H et $^{31}$P. A température ambiante (Figure 4-15a), le rapport signal sur bruit reste faible malgré un temps d'acquisition conséquent (~ 5h). On remarque néanmoins trois corrélations assez nettes : $\delta_{iso}(^{31}P)$ = 4,6 ppm ↔ $\delta_{iso}(^{1}H)$ = 8,7 ppm ; $\delta_{iso}(^{31}P)$ = 0,3 ppm ↔ $\delta_{iso}(^{1}H)$ = 5,0 ppm et $\delta_{iso}(^{31}P)$ = 0,3 ppm ↔ $\delta_{iso}(^{1}H)$ = 7,4 ppm.

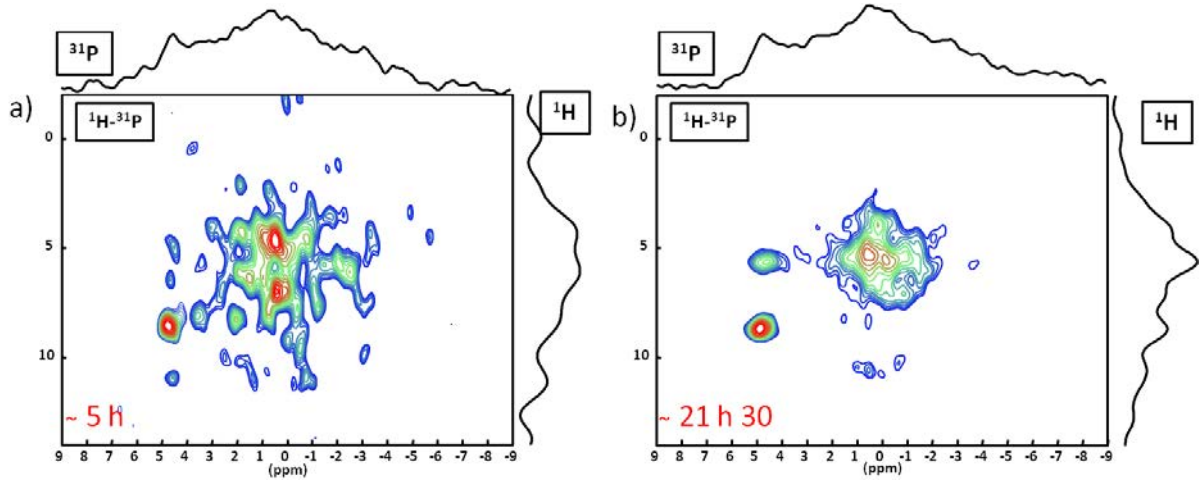



**Figure 4-15 : Spectres 2D $^{1}$H → $^{31}$P HETCOR CP MAS du calcul rénal KS 4 à différents $\tau_{CP}$. a) $\tau_{CP}$ = 0,5 ms ; d1 = 3 s ; RO = 12,5 kHz et T°ambiante. b) $\tau_{CP}$ = 5,0 ms ; d1 = 3 s ; RO = 30 kHz et T = 253 K.**

Afin d'augmenter significativement le rapport signal/bruit de l'expérience, nous avons modifié profondément les conditions expérimentales (Figure 4-15b). L'expérience a été conduite à très haute fréquence de rotation MAS (30 kHz) de façon à améliorer la résolution (en particulier sur la voie $^{1}H$) et en régulant la température à 253 K. Le temps de contact a également été augmenté ($\tau_{CP}$ = 5,0 ms). (Le nombre d'incréments $t_1$ est largement augmenté par rapport à l'expérience présentée sur la Figure 4-15a).

Les observations sont les suivantes. Il est clair désormais que la corrélation $\delta_{iso}(^{31}P)$ = 4,6 ppm ↔ $\delta_{iso}(^{1}H)$ = 8,7 ppm est bien significative. Une attribution plausible est la présence de struvite, $NH_4MgPO_4{\cdot}6H_2O$. En effet, des déplacements chimiques déblindés (en particulier pour $N\underline{H}_4^+$) sont attendus dans ce cas. Bak *et coll*. [5] ont montré que la struvite issue des calculs rénaux présente une certaine variabilité de $\delta_{iso}(^{31}P)$ (voir ci-dessus). Une corrélation $\delta_{iso}(^{31}P)$ = 4,6 ppm ↔ $\delta_{iso}(^{1}H)$ = 5,7 ppm (molécules d'eau) est également mise en évidence. La quantité de struvite est très faible si l'on se reporte au spectre $^{31}P$ MAS HPDEC.

La résonance à $\delta_{iso}(^{31}P)$ = 0,3 ppm pourrait être attribuée à des phosphates présents dans des phospholipides, en présence de molécules d'eau (voir la corrélation sur la Figure 4-15b). En effet, $\delta_{iso}(^{31}P)$ pour de tels composés se situent dans la gamme $\sim -1$ à $\sim$ 1 ppm. Néanmoins, peu de corrélations sont observées avec des déplacements chimiques $^{1}H$ inférieurs à 3 ppm, caractéristiques des longues chaînes alkyles des phospholipides. Nous optons donc pour des orthophosphates minéraux. Nous complétons nos attributions (à l'état d'hypothèses (!)…) par : ***(i)*** $\delta_{iso}(^{31}P)$ = 2,8 ppm : phosphate de calcium amorphe peu (ou pas) protoné (sous-estimé en polarisation croisée), ***(ii)*** $\delta_{iso}(^{31}P)$ << 0,0 ppm : polyphosphates (voir Figure 4-14).

Cette toute dernière hypothèse pourrait être confirmée ou infirmée par la mise en œuvre de la séquence $^{31}P$ INADEQUATE MAS [27], [28]. Celle-ci permet en effet d'établir une distinction nette entre orthophosphates et pyro-/polyphosphates. Elle présente néanmoins l'inconvénient d'être relativement peu sensible : nous n'avons pas poursuivi dans cette voie.

### d) "La" plaque de Randall : un challenge spectroscopique

Nous avons noté ci-dessus que l'étude des phosphates de "trame" par RMN $^{31}P$ était limitée, du fait de la faible sensibilité des expériences. Notre but est ici de nous pencher sur les caractérisations possibles (par RMN) d'une *unique* plaque de Randall (PR) (apatite carbonatée). Les dimensions caractéristiques de la RP sont telles que la masse d'apatite correspondante est de l'ordre de 50 à 200 µg (!). Au jour d'aujourd'hui, des techniques de caractérisation beaucoup plus sensibles (comme la fluorescence X et la microdiffraction des rayons X [29]) ont été mises en œuvre. En ce qui concerne la RMN, nous citons tout d'abord une remarque extraite de la conclusion d'un article de Reid *et coll*. [4] :

*"Unfortunately it is challenging to collect sufficient Randall's plaque material in the mg to tens of mg quantities necessary for $^{13}C\{^{31}P\}$ REDOR".*

Outre le problème intrinsèque de sensibilité dû à la faible masse de l'échantillon *unique*, il a été évoqué plusieurs fois au cours de ce manuscrit, que l'hydroxyapatite peut être substituée par plusieurs cations et anions (dont les carbonates). Nous ajoutons ici que la plaque de Randall est

délicate à manier du fait de sa petite taille. Notre approche a été la suivante : dans un premier temps, un clinicien de l'hôpital Tenon a sélectionné un calcul présentant une RP de "grande taille".

**Figure 4-16 : Photo du calcul rénal non broyé associé à la plaque de Randall étudiée ; un rotor de 2,5 mm est placé à côté pour comparaison.**

Le calcul n'est pas très volumineux en lui-même (voir Figure 4-16), ce qui indique une croissance limitée dans le temps de celui-ci. Caractérisé par FTIR, il est constitué *majoritairement* de COM. La RP a alors été délicatement extraite du calcul. Nous avons décidé d'étudier la RP et le calcul *sans les broyer* et en les *centrant* dans le rotor à l'aide d'inserts. La sonde compatible de plus faible diamètre (ici 2,5 mm) a été utilisée, de façon à maximiser les caractéristiques RF du champ $B_1$ (les rotors de diamètre 1,3 mm se sont avérés être trop étroits pour les échantillons choisis). Des expériences $^{1}H$, $^{31}P$ (1D et 2D) et $^{13}C$ ont été tentées.

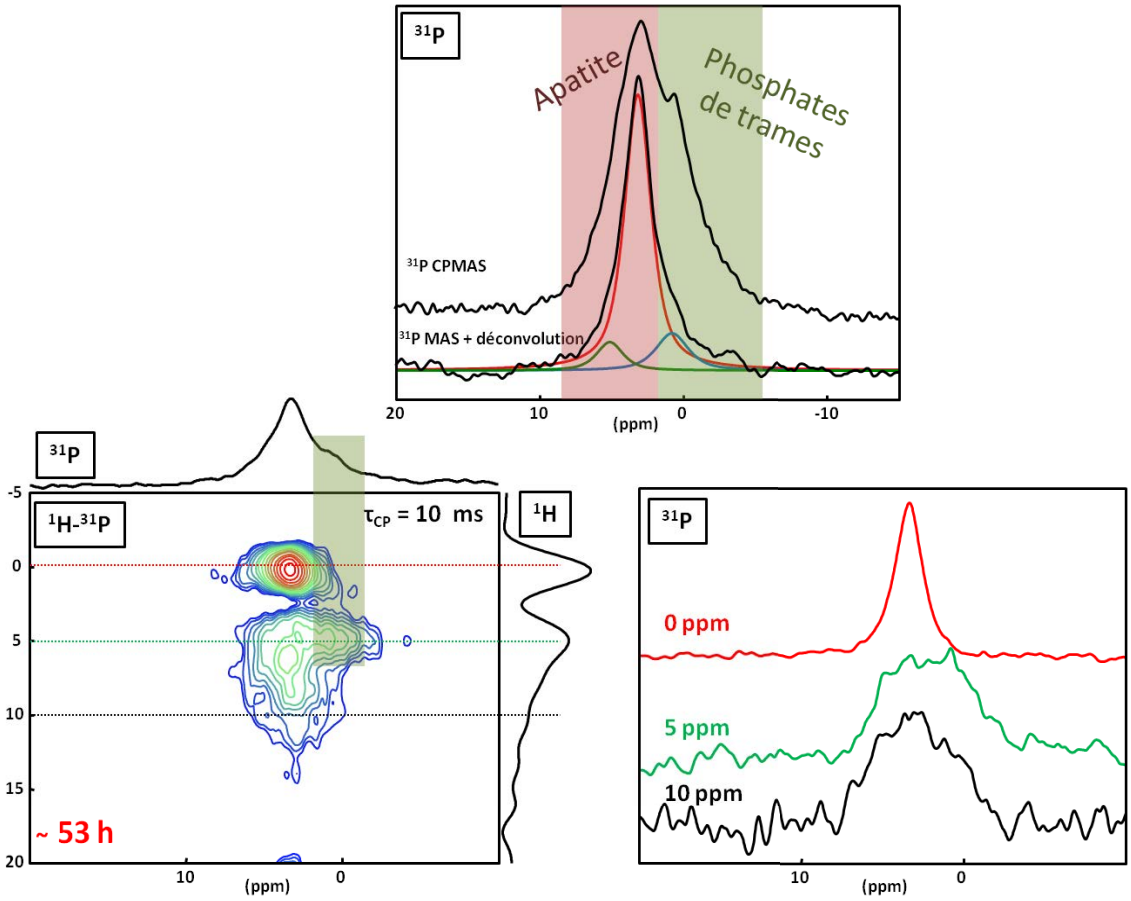



**Figure 4-17 : Spectres $^{31}P$ MAS ; délai de relaxation : 60 s et $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$ CP MAS délai de relaxation : 5 s et $\tau_{CP}$ = 2 ms du calcul sans plaque de Randall (voir Figure 4-16), RO = 14 kHz. Sonde 2,5 mm. Fréquence de rotation : 14 kHz. En bas : spectre 2D $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$ HETCOR RMN MAS du calcul, $\tau_{CP}$ = 10 ms et à sa droite : tranches extraites de l'expérience HETCOR, délai de relaxation : 2 s, NS = 2800 et 32 incréments $t_1$.**

Sur la Figure 4-17, nous présentons la comparaison entre la séquence de polarisation croisée et d'acquisition directe, cette dernière permettant de mettre en évidence les phosphates dits de « trame ». Ces phosphates de trame sont présents en très faible quantité et sont donc sous-estimés dans l'expérience $^{31}$P MAS. La majorité des phosphates du calcul semble issue d'apatite (~ 85 % d'après la déconvolution). Le spectre 2D associé permet de conforter notre idée d'un calcul composé des deux types de phosphates (apatitiques très majoritaires et de « trame »). On peut encore une fois noter la différence de largeur entre les signaux $^{31}$P de l'apatite bien « cristallisée » et les phosphates désordonnés (y compris ceux de « trame »). Le temps expérimental est élevé, de l'ordre de 53 heures.

Les spectres $^{31}$P MAS de la PR *unique* sont présentés sur le Figure 4-18. Globalement, le rapport signal/bruit est correct mais les temps d'acquisition sont longs (à cause notamment du délai de relaxation de 60 s)). Les spectres $^{31}$P MAS HPDEC et CP MAS présentent des largeurs de raie assez différentes : le transfert CP $^{1}$H → $^{31}$P donne plus de poids relatif à des composantes larges [30], [31].

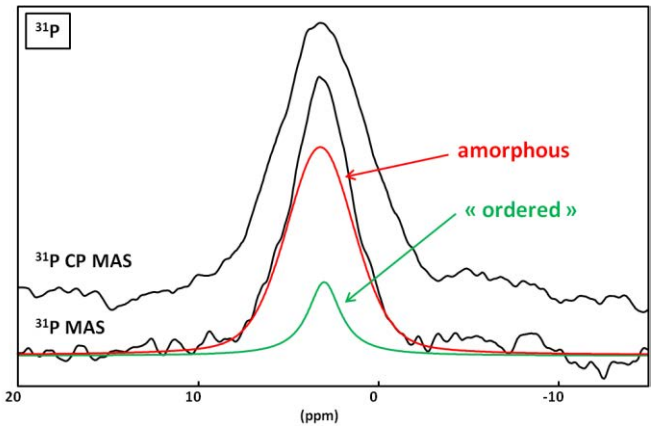



**Figure 4-18 : Spectres $^{31}$P MAS ; délai de relaxation : 60 s et $^{1}$H → $^{31}$P CP MAS délai de relaxation : 3 s et $\tau_{CP}$ = 2 ms de la plaque de Randall, RO = 14 kHz. Une déconvolution permet d'estimer la partie amorphe et la partie cristalline.**

Le déplacement chimique moyen (~ 3,2 ppm) est en accord avec la présence d'une phase apatitique substituée. La décomposition du spectre $^{31}$P MAS (Figure 4-18) en deux composantes parait raisonnable : l'une des résonances, large, est attribuée à une composante amorphe (ou très désordonnée) alors que la seconde est beaucoup plus fine. Nous attribuons cette dernière à une composante beaucoup plus « *ordonnée* ». Malgré des temps d'acquisition très longs (de 30 à 40 heures), des expériences 2D de type HETCOR ont pu être obtenues pour deux temps de contact différents (Figure 4-19). Le temps de contact a une influence notable sur les corrélations obtenues. En particulier, la corrélation entre $\delta_{iso}(^{31}P) \approx 3{,}3$ ppm ↔ $\delta_{iso}(^{1}H) = 0{,}0$ ppm (hydroxyles de la structure apatitique) est particulièrement nette à long temps de contact. A $\tau_{CP}$ = 10 ms, il semble que l'on favorise le cœur « ordonné » de la PR (spectre en rouge en bas à droite de la Figure 4-19).

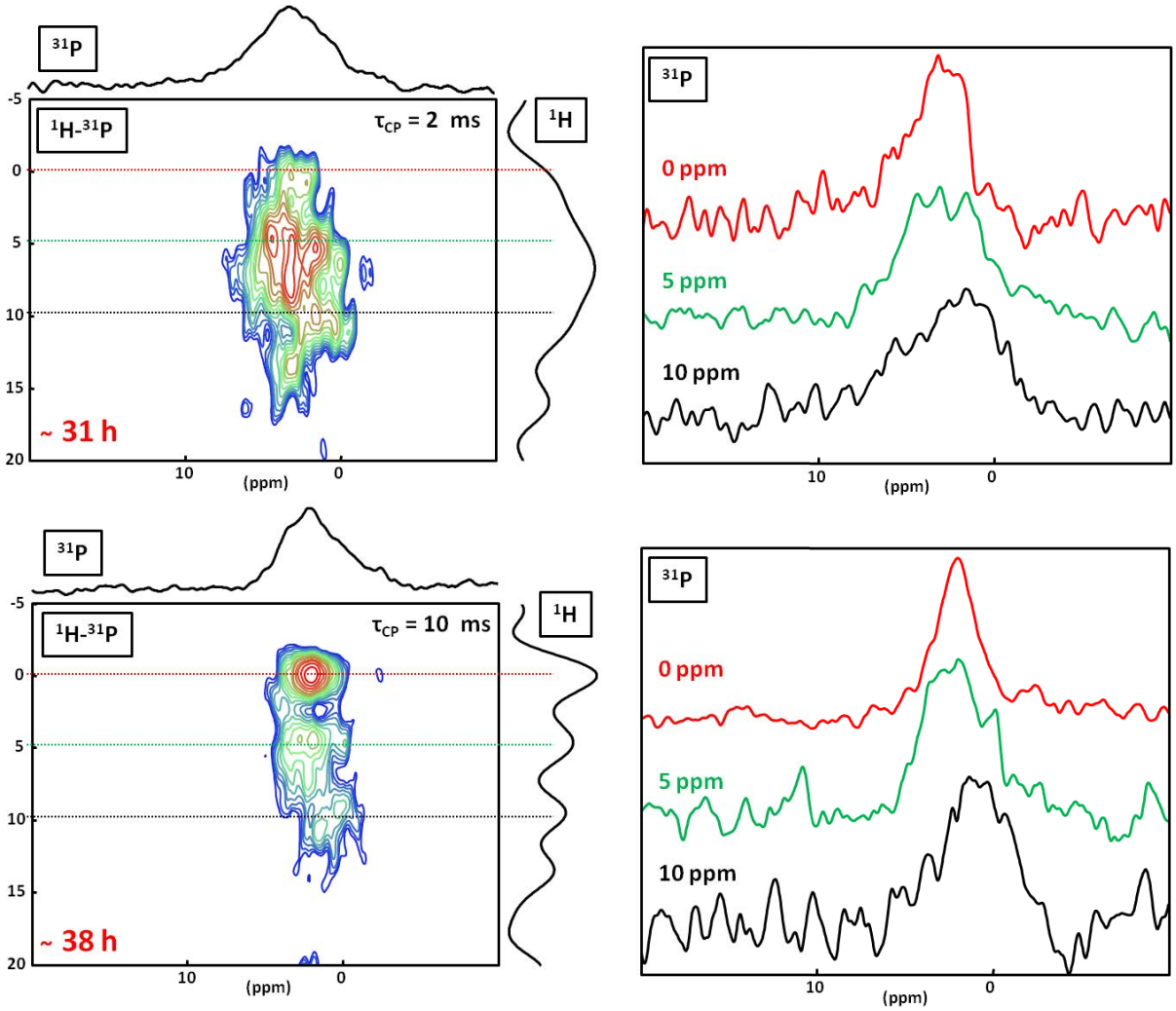



**Figure 4-19 : Spectres 2D $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$ HETCOR CP MAS d'une plaque de Randall *unique*. Sonde 2,5 mm. Fréquence de rotation : 14 kHz. En haut : $\tau_{CP}$ = 2 ms et à sa droite, tranches extraites de l'expérience HETCOR, délai de relaxation : 2 s, NS = 2800 et 20 incréments $t_1$. En bas: $\tau_{CP}$ = 10 ms et à sa droite, tranches extraites de l'expérience HETCOR, délai de relaxation : 2 s, NS = 2800 et 24 incréments $t_1$.**

Dans les cartes 2D obtenues (Figure 4-19), des corrélations mettant en jeu des molécules d'eau (~ 5-6 ppm) et des ions $HPO_4^{2-}$ (> ~ 10 ppm) sont mises en évidence [31], [32].

Les essais effectués par RMN $^{13}C$ CP MAS à partir de la plaque de Randall *unique* se sont soldés par un quasi-échec. Après plus de 43 heures d'acquisition sur un spectromètre 700 MHz, le rapport signal/bruit reste très faible (voir Figure 4-22 de la Partie 3 de ce Chapitre). Comme annoncé ci-dessus par Reid *et coll.* au début de ce paragraphe, *il est effectivement totalement impossible d'envisager une expérience de type $^{13}C\{^{31}P\}$ REDOR en abondance naturelle $^{13}C$ sur cet échantillon biologique.* Compte tenu de nos acquis concernant les composés apatitiques synthétiques (Chapitre 3 partie 2), nous avons exploré les possibilités offertes par le RMN DNP CP MAS.

En conclusion, calculs et plaque de Randall se prêtent particulièrement bien à une étude par RMN multinucléaire ($^{1}H$, $^{13}C$, $^{31}P$, $^{43}Ca$) et multidimensionnelles, mettant en œuvre des expériences fondées sur l'interaction dipolaire hétéronucléaire et sur l'interaction de couplage J. En particulier, les points suivants ont été abordés : ***(i)*** *édition spectrale* complète des spectres $^{13}C$ CP MAS, ***(ii)*** mise en évidence et caractérisation détaillée des phosphates de « trame ». Ce dernier point sera sans

doute d'intérêt pour les cliniciens. Dans le cas d'une *unique* plaque de Randall (masse très faible d'échantillon), des problèmes sérieux de sensibilité sont apparus lors des expériences $^{13}$C CP MAS. De tels problèmes correspondent à la limite de sensibilité intrinsèque des expériences de RMN standard conduite à température ambiante et à 700 MHz. Dans la partie 4 de ce Chapitre, nous envisageons l'utilisation de l'approche DNP CP MAS.

## 3. RMN DNP MAS : applications à l'étude des calculs rénaux et de la plaque de Randall

La technique DNP CP MAS à basse température (100 K) est décrite brièvement dans le Chapitre 2. Les applications potentielles de la technique dans le cadre des phosphates et oxalates de calcium *synthétiques* sont présentées dans le Chapitre 3. Dans cette section, nous tentons de pousser les limites de la DNP CP MAS en vue d'étudier des assemblages biologiques complexes, de type nanocomposite hybride, organique-inorganique. Dans un premier temps, nous allons utiliser le calcul KS 3 comme composé de référence (voir Figure 4-12 ci-dessus). En effet, KS 3 est caractérisé par une phase COM *majoritaire* et une fraction importante de matrice organique. Nous avons mis en place un protocole d'*édition spectrale* efficace à l'aide de ce calcul particulier (voir paragraphe 2.b).). Nous allons mettre en évidence les difficultés rencontrées dans le choix de la combinaison solvant/biradical ("DNP juice"). Dans un deuxième temps, nous étendrons l'expérience DNP $^{31}$P et $^{13}$C CP MAS à l'étude d'une plaque de Randall *unique*.

### a) KS 3 : un prototype pour les études par DNP CP MAS

Comme démontré précédemment, les calculs rénaux présentent la particularité d'être hétérogènes au niveau de leur composition et de leur architecture 3D. Cette hétérogénéité intrinsèque pose immédiatement le problème du choix du solvant DNP, sachant que la compatibilité entre des composantes minérales/organiques, hydrophiles/hydrophobes… ne sera pas nécessairement assurée (il y a d'ailleurs peu de chance qu'un solvant puisse être considéré comme "universel" de ce point de vue là…). Il se pose *a priori* un autre problème, lié à la "construction" dans l'espace du nanocomposite : certaines composantes peuvent être "insérées" dans d'autres et seront donc beaucoup moins sensibles à l'effet DNP pour des raisons de distances trop élevées entre les noyaux d'intérêt et les premiers protons hyperpolarisés par les biradicaux (et ce, malgré l'éventuel relai de la diffusion de spins $^{1}$H–$^{1}$H – voir Chapitre 3 dans le cas de l'HAp substituée par des carbonates). N'oublions pas qu'il a été démontré dans le passé que l'expérience DNP MAS était particulièrement sensible aux *surfaces* mises en jeu. Avant toute expérience de DNP, nous gardons à l'esprit d'éventuels problèmes de quantification relative des phases impliquées et la nature *surfacique* de cette approche spectroscopique particulière.

Du point de vue expérimental, nous avons suivi strictement le protocole décrit dans le Chapitre 3 partie 3 a). : broyage du calcul KS 3, imprégnation avec le mélange biradical/solvant choisi, utilisation de rotors 3,2 mm en saphir, puis refroidissement rapide de l'ensemble à 100 K dans le sonde DNP MAS. N.B. : Globalement, les mêmes masses, volumes et concentrations respectifs ont été utilisés.

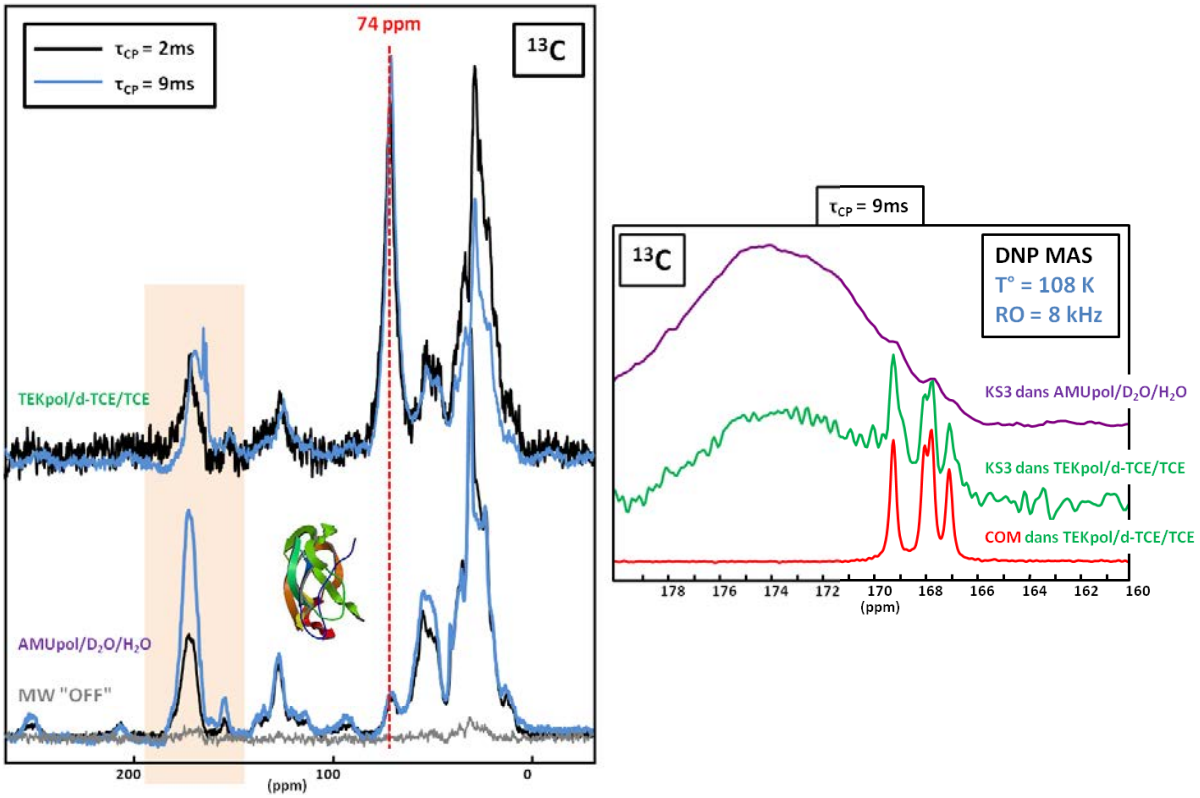



**Figure 4-20 : Spectres $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ DNP CP MAS de l'échantillon KS 3. Les mélanges AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ et TEKpol/d-TCE/TCE ont été testés. $\tau_{CP}$ = 2 ms et 9 ms. Le schéma d'une protéine indique la présence d'une forte proportion de matrice organique. Pour TEKpol/d-TCE/TCE, délai de relaxation : 2,6 s ; pour $\tau_{CP}$ = 2 ms, NS = 64 et pour $\tau_{CP}$ = 9 ms, NS = 1648. Pour AMUpol H2O, d1 = 6,5 s ; pour $\tau_{CP}$ = 2 ms NS = 192 et pour $\tau_{CP}$ = 9 ms NS = 192.**

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 4-20 (à gauche). Dans le cas du mélange AMUpol/$D_2O$/$H_2O$, on observe un effet DNP très marqué en $^{13}$C DNP CP MAS. La matrice organique est clairement détectée et $\varepsilon(^{13}C)_{ON/OFF} \sim 28$. Un autre fait remarquable est observé : à long temps de contact ($\tau_{CP}$ = 9 ms), les effets de $T_{1\rho}(^{1}H)$ sont beaucoup moins marqués qu'à température ambiante (voir Figure 4-12). Nous avions déjà fait une telle observation lors de la mise en place de l'expérience $^{43}$Ca DNP CP MAS (voir Chapitre 3 partie3 d).). Il est probable qu'à basse température, d'éventuelles interférences destructives entre la valeur du champ RF, $B_1(^{1}H)$ (en kHz), et des mouvements locaux de fréquences caractéristiques comparables, soient largement minimisées. Il s'agit d'un point positif pour la sensibilité de l'expérience, mais qui est indépendant de l'effet DNP en lui-même (il s'agit d'un effet de température). Une analyse détaillée de la zone 160-180 ppm (Figure 4-20 à droite) est révélatrice d'un des problèmes de l'approche DNP énoncé ci-dessus. Le signal est dominé par la contribution des groupements carbonyles (~ 175 ppm) de la matrice organique. Les résonances de la phase COM (situées à entre 167 et 169 ppm) sont à peine détectables, même pour un temps de contact long ($\tau_{CP}$ = 9 ms). Leur observation est néanmoins fiable car le rapport signal/bruit est très élevé et que nous possédons la signature spectroscopique du COM en DNP $^{13}$C CP MAS. De fait, ce résultat n'est guère surprenant. En effet, nous avons montré dans le Chapitre 3 partie 4 a). que la combinaison AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ n'était pas la plus adaptée ($\varepsilon(^{13}C)_{ON/OFF} \sim 2$) dans le cas des cristaux de COM synthétiques. Nous avions également prouvé que le mélange TEKpol/d-TCE/TCE était beaucoup plus efficace vis-à-vis de l'effet DNP ($\varepsilon(^{13}C)_{ON/OFF} \sim 22$). La Figure 4-20 présente les spectres DNP $^{13}$C CP MAS (à deux temps de contact) de KS 3, en utilisant le mélange TEKpol/d-TCE/TCE. Une fois encore, l'effet DNP est marqué au niveau de la matrice organique mais beaucoup moins que dans le

cas AMUpol/$D_2O$/$H_2O$. En revanche, pour $\tau_{CP}$ = 9 ms, les résonances du COM sont beaucoup plus visibles (Figure 4-20, à droite). En d'autres termes, les groupements oxalates de la phase COM semblent accessibles à l'effet DNP, à condition d'utiliser le solvant adéquat. De fait, il faut affiner cette hypothèse et dire qu'*au moins une partie des oxalates* est sensible à l'hyperpolarisation DNP. Une étape supplémentaire dans la quantification des composantes minérales et organiques pourrait être franchie en comparant les résultats des Figure 4-12 et Figure 4-20, ainsi que la donnée d'un spectre $^{13}$C HPDEC MAS *totalement relaxé* de KS 3.

Dans le cas de l'utilisation du TCE, nous mentionnons enfin la présence d'un pic très intense à 74 ppm qui correspond au solvant. Ce point peut être ennuyeux car ce pic intense peut masquer des résonances d'intérêt (c'est le cas pour l'échantillon KS 3) (carbones des glucides des glycosaminoglycanes à ~ 76 ppm [4], par exemple).

### b) Etude d'une *unique* plaque de Randall par RMN DNP CP MAS.

Nous allons conclure ce Chapitre par la présentation des résultats de la caractérisation d'une unique plaque de Randall par DNP CP MAS ($^{31}$P et $^{13}$C). Nous avons étudié la *même plaque* que celle précédemment décrite et étudiée par des techniques standard de RMN (voir Partie 2 d). de ce Chapitre). Cette fois, la plaque a été immergée (sans broyage) dans un mélange AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ (présenté ci-dessus), qui nous est apparu cohérent compte tenu de la nature apatitique de la plaque (voir Figure 4-21).

**Figure 4-21 : Préparation des expériences DNP CP MAS dans le cas d'une *unique* plaque de Randall. Le choix de $CaF_2$ est motivé par les résultats de Kubicki *et coll*.** [33].

Bien sûr, il s'agit d'une expérience qui ne pourra pas être ni répétée, ni ré-optimisée ! Dans un sens, nous avons confiance dans les résultats obtenus précédemment dans le cadre de l'étude par DNP des apatites substituées synthétiques. Une fois immergée dans la solution, on observe un gonflement assez important de la RP. Celle-ci est laissée à reposer une dizaine de minutes. Elle est ensuite récupérée (par centrifugation douce) et centrée dans un rotor en saphir de 3,2 mm. Au-dessus et en dessous de la plaque, le rotor a été rempli à l'aide d'un sel non soluble dans l'eau, $CaF_2$. Ce choix très particulier a été orienté par un travail récent de Kubicki *et coll*. montrant que certains sels étaient capables, d'une certaine manière, de "concentrer" le rayonnement microonde à l'intérieur du rotor (diffusion, diffraction et amplification du champ microonde dans l'échantillon) [33]. Nous notons à ce stade que le coefficient de remplissage de la bobine est loin d'être optimal : celui-ci pourrait être optimisé *via* l'utilisation d'une microbobine [34]. La suite du protocole expérimental est identique à celui présenté dans la partie 3 a).

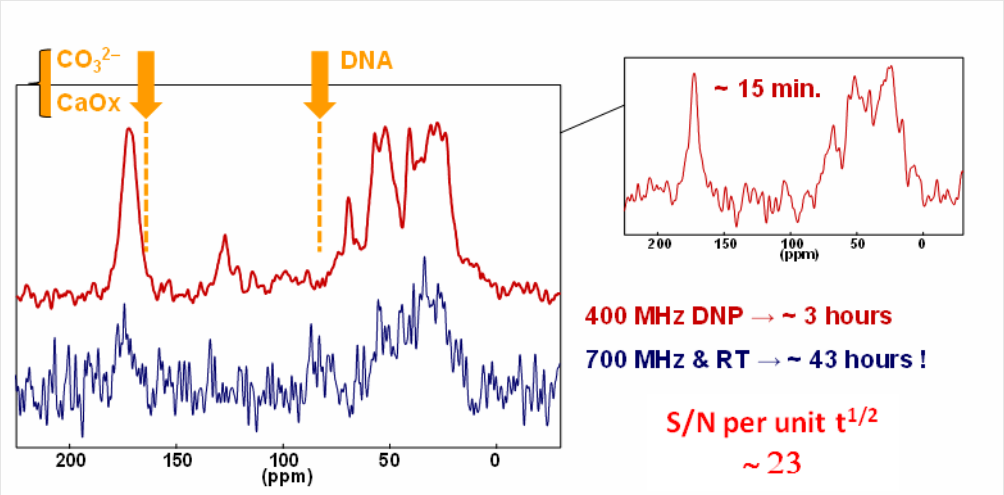



**Figure 4-22 : Spectre DNP $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ CP MAS de KS 3 comparé au spectre $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ CP MAS classique de KS 3 obtenu par RMN standard (température ambiante, 700 MHz).**

Les résultats des expériences $^{13}C$ DNP CP MAS sont présentés sur la Figure 4-22. Tout d'abord, nous remarquons qu'un effet DNP est parfaitement mesurable ! Un spectre acceptable est obtenu en 15 minutes. En 3 heures (voire moins…), le signal est suffisamment important pour envisager des expériences 2D $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ ou $^{13}C$ {$^{31}P$} REDOR (voir la remarque de Reid *et coll.* ci-dessus). Dans ce cas, nous avons pu estimer un ASR [35], car nous avons enregistré un spectre $^{13}C$ par RMN standard (température ambiante, 700 MHz, 43 heures) : ASR (*Absolute Sensitive Ratio*) ~ 23, ce qui implique un gain en temps expérimental de l'ordre de ~ 530 ! L'attribution correspond à une matrice organique comparable à celle observée précédemment. Il est difficile de distinguer les carbonates éventuellement présents au sein de la plaque (ceux-ci étant en substitutions des sites A et/ou B). Leurs déplacements chimiques sont en effet très proches de ceux des groupements carbonyles de la matrice organique (voir Figure 4-23). En revanche, ceux-ci pourraient être caractérisés par $^{13}C\{^{31}P\}$ DNP CP REDOR MAS (nous n'avons pas eu le temps d'effectuer cette expérience). De même, il est très difficile de mettre en évidence une faible quantité éventuelle d'oxalates de calcium. Enfin, une discussion avec le Pr M. Duer nous a conduits à nous poser la question de la présence éventuelle de fragments d'ADN provenant de l'endommagement des cellules au moment de la croissance de la RP. L'ADN est caractérisé par un pic $^{13}C$ très intense localisé à ~ 85 ppm. Comme noté précédemment, les effets de $T_{1\rho}(^{1}H)$ sont beaucoup moins prononcés qu'à température ambiante (Figure 4-23, $\tau_{CP}$ = 2 et 9 ms).

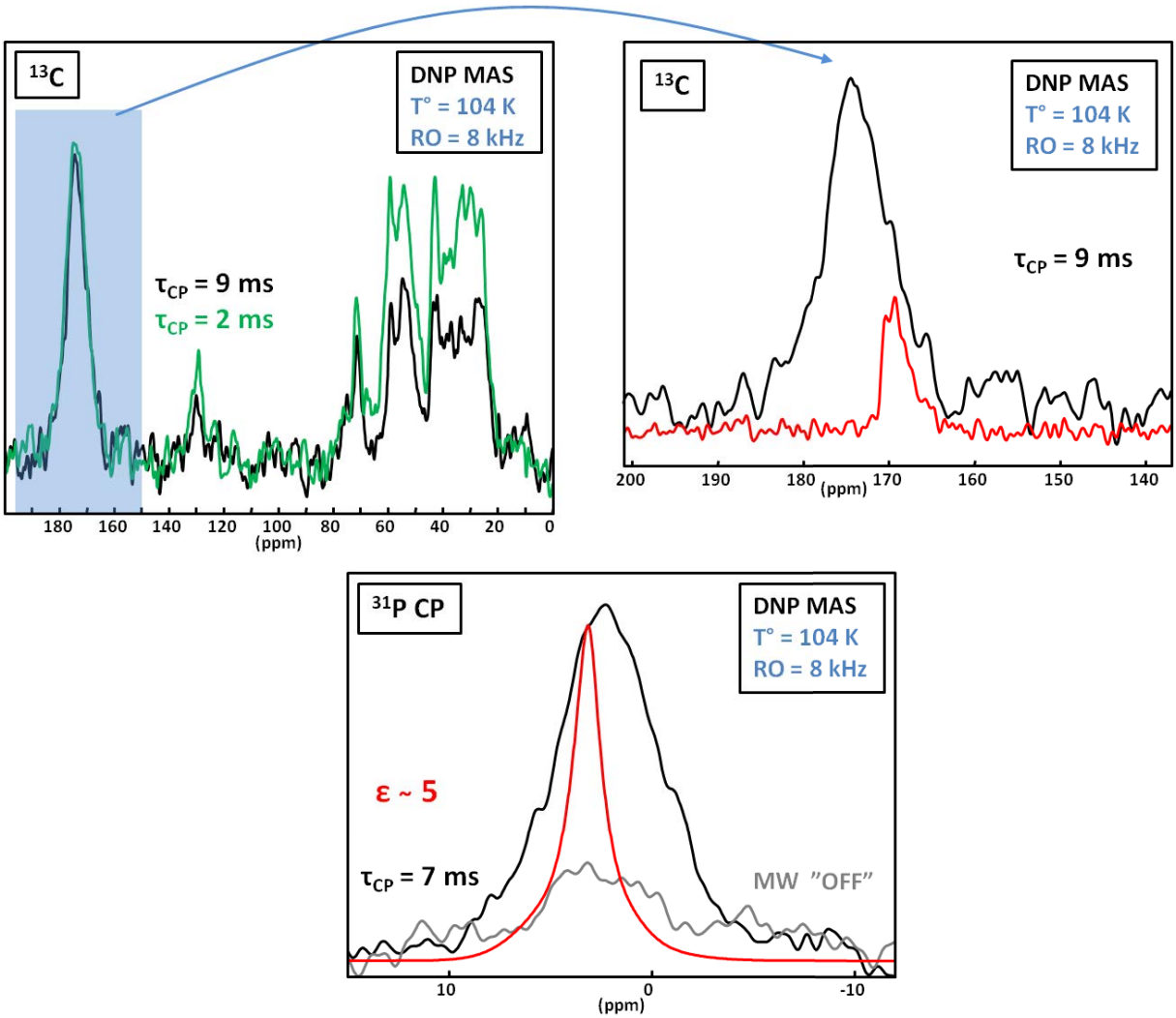



**Figure 4-23 : Spectres $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ et $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$ DNP CP MAS d'une plaque de Randall *unique*. AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ (9/1). Les expériences $^{13}C$ DNP CP MAS ont été réalisées à deux temps de contacts différents : $\tau_{CP}$ = 9 ms (en noir) et $\tau_{CP}$ = 2 ms (en vert). Les spectres en rouge permettent des comparaisons : spectre $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ DNP CP MAS de CHAp synthétique (non enrichie en $^{13}C$) ($\tau_{CP}$ = 9 ms), spectre $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$ DNP CP MAS de CHAp synthétique (voir Chapitre 3).**

La mesure de $\varepsilon(^{31}P)_{ON/OFF}$ conduit à ~ 5 pour $\tau_{CP}$ = 7 ms (Figure 4-23). Cette valeur peut paraître faible, comparée à celle obtenue (~ 25) dans le cas de nanoparticules d'apatites substituées (voir Chapitre 3, partie 3). Il faut rappeler ici que les particules d'HAp sont beaucoup plus volumineuses – de taille ~ 500 nm à 1 µm (voir Chapitre 1). L'expérience est dans ce cas sensible à la *surface* des particules d'apatite. On note également que la largeur de raie $^{31}P$ DNP CP MAS est beaucoup plus large que dans le cas de CHAp. Ceci rend compte d'un désordre particulièrement important en surface des particules. Cette hypothèse a été confirmée par une expérience 2D de type $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$ HETCOR (Figure 4-24). En 7 heures environ, une carte 2D tout à fait exploitable est obtenue. Nous confirmons qu'il est donc possible d'étudier une plaque de Randall *unique* par DNP bidimensionnelle. De plus, en analysant de manière détaillée les tranches correspondant aux résonances $OH^-$, $H_2O$ et $HPO_4^{2-}$, nous remarquons que les largeurs de raie sont comparables, preuve du désordre local.

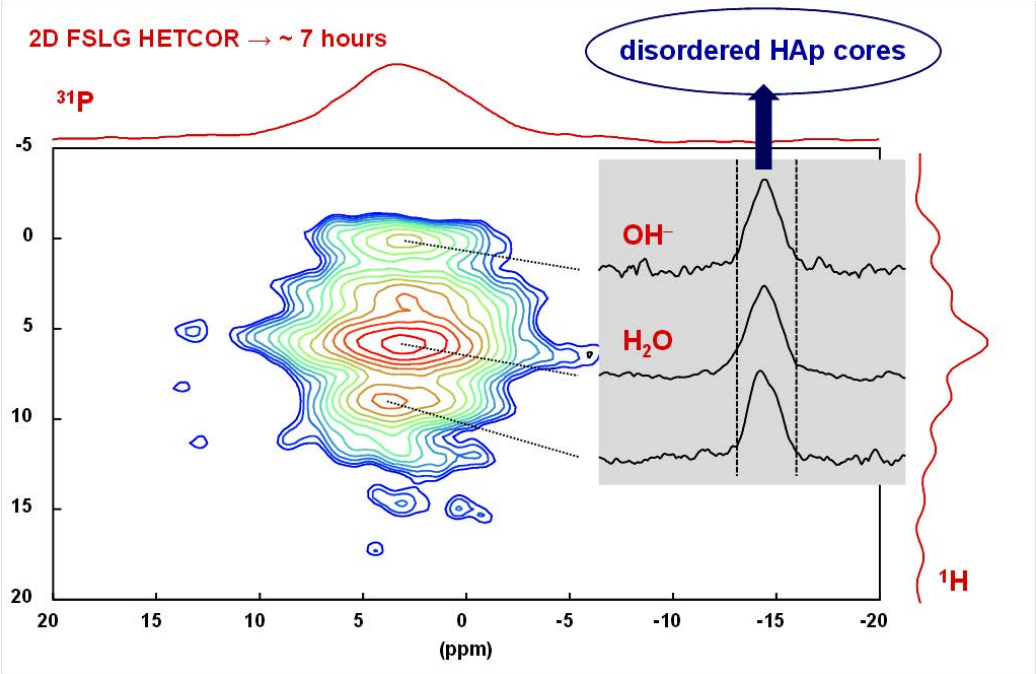



**Figure 4-24 : Spectre 2D $^{1}H\rightarrow {}^{31}P$ DNP HETCOR CP MAS de la plaque Randall. Délai de relaxation : 12 s, $\tau_{CP}$ = 7 ms, NS = 16 et incréments $t_1$ = 128. Découplage FSLG durant l'évolution $^{1}H$ en $t_1$.**

Enfin, nous présentons sur la Figure 4-25, les expériences DNP CP MAS relatives au calcul rénal issu de la plaque de Randall étudiée précédemment. La préparation de l'échantillon est strictement analogue à celle de la RP associée. Il s'agit d'un calcul de petite taille (voir Figure 4-16) qui a été broyé délicatement.

Le contenu carboné est bien caractérisé : une phase cristallisée de COM (4 résonances résolues) et une composante *très minoritaire* de matrice organique : massifs à ~ 175, 50 et 30 ppm ($\varepsilon(^{13}C)_{ON/OFF} \sim 8$). Il est possible d'affirmer que la quantité de matrice organique est très faible. De fait, nous avons utilisé le mélange AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ (90/10) qui favorise l'observation par DNP de cette composante (voir Figure 4-20). Le spectre $^{31}P$ DNP CP MAS est compatible avec la présence d'apatite et de phosphates de "trame" tels que ceux caractérisés sur la Figure 4-17 de ce Chapitre ($\varepsilon(^{31}P)_{ON/OFF} \sim 4,5$). Notons qu'un tel spectre est obtenu en seulement 3 minutes.

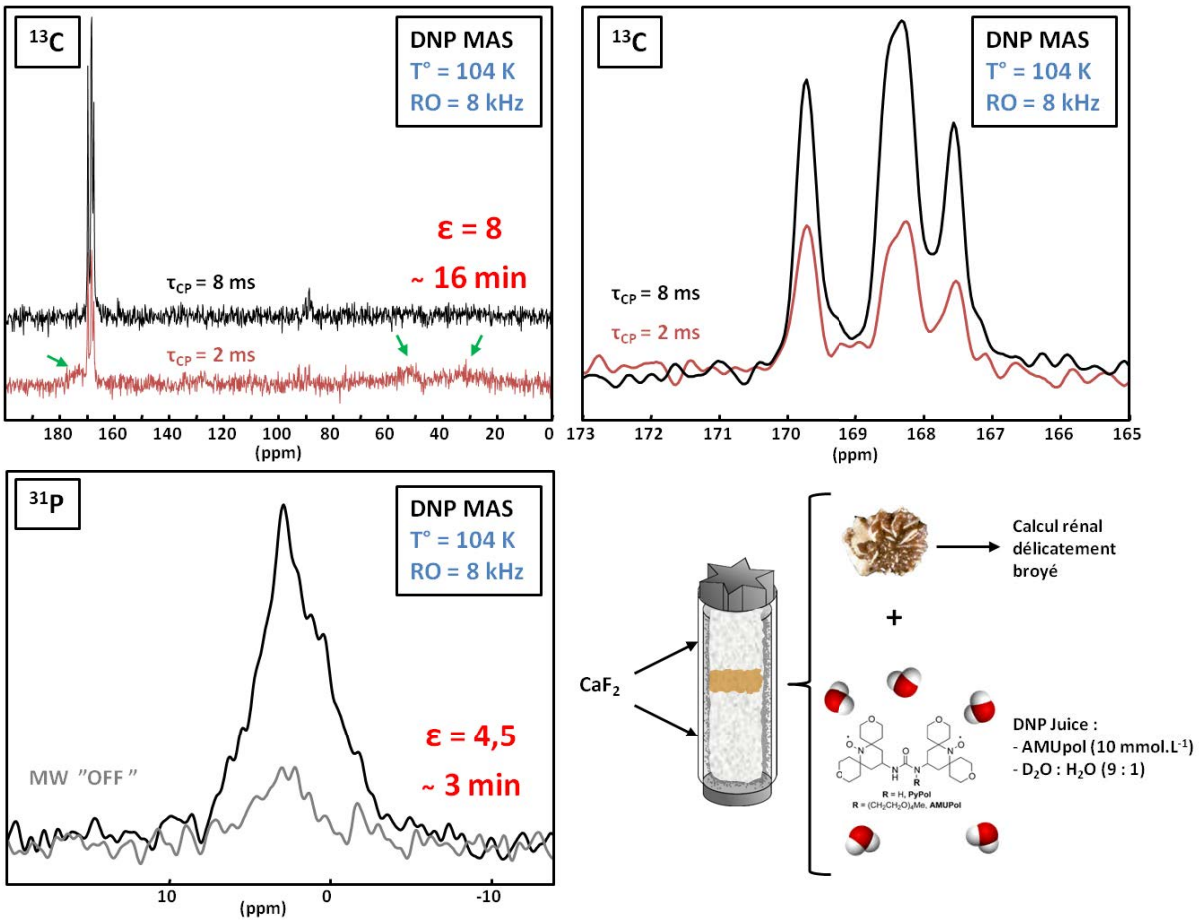



**Figure 4-25 : Spectres $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ et $^{1}H \rightarrow {}^{31}P$ DNP CP MAS du calcul rénal associé à la plaque de Randall présentée sur la Figure 4-21. AMUpol/$D_2O$/$H_2O$ (9/1). Les expériences $^{1}H \rightarrow {}^{13}C$ DNP CP MAS ont été réalisées à deux temps de contacts différents : $\tau_{CP}$ = 8 ms (en noir) et $\tau_{CP}$ = 2 ms (en rouge).**

L'approche DNP CP MAS peut manifestement être étendue à l'étude des KS et de la plaque de Randall (*unique*). Les questions soulevées, telles que l'impact de l'hétérogénéité de composition et de structure sur l'effet DNP observé, sont généralisables à toute étude de nano-(bio)-composites d'origine naturelle. Les résultats préliminaires obtenus ici sont de bon augure pour une généralisation de l'approche DNP CP MAS dans le domaine des phosphates et oxalates de calcium.

## 4. Conclusion

Ce chapitre fait suite aux résultats obtenus dans le cadre de l'étude des phases synthétiques d'oxalates et de phosphates de calcium. Il était volontairement exploratoire, en particulier dans l'application de la DNP CP MAS à la caractérisation des calculs rénaux et de la plaque de Randall. Bien que préliminaires, les résultats et observations présentés dans ce Chapitre sont encourageants et ont soulevés un certain nombre de questions d'intérêt pour une approche plus systématique dans un futur proche.

Dans un premier temps, nous avons démontré que l'utilisation de techniques d'*édition spectrale* en RMN $^{13}C$ permettait de dresser un panorama complet du contenu carboné d'un calcul rénal (organique et inorganique). Lorsque les phases organiques et inorganiques sont "disjointes", des variations fortes de $T_{1\rho}(^{1}H)$ sont mises en évidence par RMN $^{13}C$ CP MAS. Au-delà de cette observation, il serait intéressant de pousser l'étude d'éventuelles interfaces organiques-inorganiques

en mettant en jeu des expériences de diffusion de spin $^{1}H–^{1}H$. L'utilisation conjointe des expériences fondées sur l'interaction dipolaire hétéronucléaire $^{1}H–^{13}C$ et $^{1}J_{1H–13C}$ de couplage indirect (composante isotrope en rotation MAS rapide) a permis de distinguer très clairement les composantes "rigides" et "mobiles" de la matrice organique permettant une reconstruction complète et fiable du spectre $^{13}C$ CP MAS initial.

Nous avions fondé de grands espoirs dans l'expérience $^{1}H$ CRAMPS du fait de sa très grande sensibilité et de la relative simplicité de sa mise en œuvre. De fait, l'utilisation de la séquence DUMBO a permis d'améliorer grandement la résolution par rapport à la rotation rapide MAS. Néanmoins, il est assez difficile de proposer des simulations non ambigües des spectres $^{1}H$ des calculs rénaux du fait de la présence des résonances de la matrice organique. Nous pensons qu'à ultra haut champ magnétique (1 GHz), un gain en résolution supplémentaire permettrait d'interpréter complètement les spectres.

La RMN $^{43}Ca$ MAS à ultra haut champ magnétique (850 MHz) est tout à fait envisageable en utilisant des rotors de grand diamètre (7 mm généralement). Les spectres nécessitent néanmoins plusieurs heures d'accumulation. Un soin particulier doit être apporté à la calibration de l'échelle de déplacements chimiques $^{43}Ca$. L'utilisation de solutions aqueuses "saturées" de $CaCl_2$ conduit à des résultats erronés.

La mise en œuvre de la technique DNP CP MAS est très prometteuse, en particulier dans le cas particulier de la plaque de Randall. A la vue de la sensibilité obtenue en $^{13}C$ et $^{31}P$, des expériences 2D sont envisageables et devraient permettre d'aller encore plus dans la compréhension de la structure détaillée de celle-ci. Des points particuliers ont émergé : ils correspondent à plusieurs défis que nous aborderons dans un futur proche. Tout d'abord, le caractère multi-composant des calculs est une difficulté certaine, sachant que le solvant DNP a une affinité plus ou moins marquée pour les différentes composantes. A l'avenir, il est apparaît nécessaire d'anticiper l'affinité des surfaces avec le « DNP juice » considéré. On pourra par exemple s'inspirer de travaux théoriques concernant la modélisation moléculaire *ab initio* des surfaces et l'évaluation de l'affinité chimique d'un couple {surface + solvant} donné. Il est important de garder également en mémoire que des phases sous-estimées par DNP peuvent être localisées à des distances importantes de la source d'hyperpolarisation.

Enfin, le cas de la RP pose un problème d'un autre ordre. Dans ce cas, la bobine correspondant à un rotor de 3,2 mm n'est clairement pas optimisée en termes de coefficient de remplissage. Néanmoins, les résultats obtenus sont originaux, tant en $^{13}C$ qu'en $^{31}P$. Nous sommes convaincus que l'utilisation de microbobines (comme dans l'expérience MACS – *Magic Angle Coil Spinning* [36]), en combinaison avec l'effet DNP, permettra d'apporter des réponses originales et efficaces à cette question.

## Bibliographie Chapitre 4 :


[1] D. Bazin, M. Daudon, C. Combes, and C. Rey, "Characterization and Some Physicochemical Aspects of Pathological Microcalcifications," *Chem. Rev.*, 112, 10, 5092–5120, **2012**.

[2] D. Bazin, C. Jouanneau, S. Bertazzo, C. Sandt, A. Dessombz, M. Réfrégiers, P. Dumas, J. Frederick, J. P. Haymann, E. Letavernier, P. Ronco, and M. Daudon, "Combining Field Effect Scanning Electron Microscopy, Deep UV Fluorescence, Raman, Classical and Synchrotron Radiation Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy in the Study of Crystal-containing Kidney Biopsies," *Comptes Rendus Chim.*, 1–12, **2015**.

[3] D. G. Reid, M. J. Duer, G. E. Jackson, R. C. Murray, A. L. Rodgers, and C. M. Shanahan, "Citrate Occurs Widely in Healthy and Pathological Apatitic Biomineral: Mineralized Articular Cartilage, and Intimal Atherosclerotic Plaque and Apatitic Kidney Stones," *Calcif. Tissue Int.*, 93, 3, 253–260, **2013**.

[4] D. G. Reid, G. J. Jackson, M. J. Duer, and A. L. Rodgers, "Apatite in Kidney Stones is a Molecular Composite with Glycosaminoglycans and Proteins: Evidence from Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, and Relevance to Randall's Plaque, Pathogenesis and Prophylaxis," *J. Urol.*, 185, 2, 725–30, **2011**.

[5] M. Bak, J. K. Thomsen, H. J. Jakobsen, S. E. Petersen, T. E. Petersen, and N. C. Nielsen, "Solid-State $^{13}C$ and $^{31}P$ NMR Analysis of Urinary Stones," 164, September, 856–863, **2000**.

[6] C. G. Kontoyannis, N. C. Bouropoulos, and P. G. Koutsoukos, "Urinary Stone Layer Analysis of Mineral Components by Raman Spectroscopy , IR Spectroscopy , and X-ray Powder Diffraction : A Comparative Study," *Appl. Spectrosc.*, 51, 8, 1205–1209, **1997**.

[7] V. Uvarov, I. Popov, N. Shapur, T. Abdin, O. N. Gofrit, D. Pode, and M. Duvdevani, "X-Ray Diffraction and SEM Study of Kidney Stones in Israel: Quantitative Analysis, Crystallite Size Determination, and Statistical Characterization," *Environ. Geochem. Health*, 33, 6, 613–622, **2011**.

[8] M. T. D. Orlando, L. Kuplich, D. O. de Souza, H. Belich, J. B. Depianti, C. G. P. Orlando, E. F. Medeiros, P. C. M. da Cruz, L. G. Martinez, H. P. S. Corrêa, and R. Ortiz, "Study of Calcium Oxalate Monohydrate of Kidney Stones by X-Ray Diffraction," *Powder Diffr.*, 23, S1, 59–64, **2012**.

[9] G. Vlahov, "Application of NMR to the Study of Olive Oils," *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 35, 341–357, **1999**.

[10] D. G. Reid, C. M. Shanahan, M. J. Duer, L. G. Arroyo, M. Schoppet, R. a Brooks, and R. C. Murray, "Lipids in Biocalcification: Contrasts and Similarities between Intimal and Medial Vascular Calcification and Bone by NMR.," *J. Lipid Res.*, 53, 1569–1575, **2012**.

[11] J. Ren, I. Dimitrov, A. Sherry, and C. Malloy, "Composition of Adipose Tissue and Marrow Fat by $^{1}H$ MR Spectroscopy at 7 Tesla," *J. Lipid Res.*, 49, 2055–2062, **2008**.

[12] H. Colas, L. Bonhomme-Coury, C. C. Diogo, F. Tielens, F. Babonneau, C. Gervais, D. Bazin, D. Laurencin, M. E. Smith, J. V. Hanna, M. Daudon, and C. Bonhomme, "Whewellite, $CaC_2O_4 \cdot H_2O$: Structural Study by a Combined NMR, Crystallography and Modelling Approach," *CrystEngComm*, 15, 43, 8840, **2013**.

[13] R. J. Kirkpatrick and G. M. Bowers, "Natural Abundance $^{43}Ca$ NMR as a Tool for Exploring

Calcium Biomineralization: Renal Stone Formation and Growth," *Cryst. Growth Des.*, 11, 5188–5191, **2011**.

[14] C. Gervais, D. Laurencin, A. Wong, F. Pourpoint, J. Labram, B. Woodward, A. P. Howes, K. J. Pike, R. Dupree, F. Mauri, C. Bonhomme, and M. E. Smith, "New Perspectives on Calcium Environments in Inorganic Materials Containing Calcium-Oxygen Bonds: A Combined Computational-Experimental $^{43}$Ca NMR Approach," *Chem. Phys. Lett.*, 464, 1–3, 42–48, **2008**.

[15] T. Bräuniger, P. Wormald, and P. Hodgkinson, "Improved Proton Decoupling in NMR Spectroscopy of Crystalline Solids Using the SPINAL-64 Sequence," *Curr. Dev. Solid State NMR Spectrosc.*, 69–74, **2003**.

[16] B. M. Fung, A. K. Khitrin, and K. Ermolaev, "An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids," *J. Magn. Reson.*, 142, 1, 97–101, **2000**.

[17] K. J. D. Mackenzie and M. E. Smith, *Multinuclear Solid-State NMR of Inorganic Materials*, Pergamon. **2002**.

[18] L. D. Brown, A. S. Ray, and P. S. Thomas, "$^{29}$Si and $^{27}$Al NMR Study of Amorphous and Paracrystalline Opals from Australia," *J. Non. Cryst. Solids*, 332, 1–3, 242–248, **2003**.

[19] J. F. Stebbins, J. R. Smyth, W. R. Panero, and D. J. Frost, "Forsterite, Hydrous and Anhydrous Wadsleyite and Ringwoodite ($Mg_2SiO_4$): $^{29}$Si NMR Results for Chemical Shift Anisotropy, Spin-lattice Relaxation, and Mechanism of Hydration," *Am. Mineral.*, 94, 905–915, **2009**.

[20] S. M. Chemtob, G. R. Rossman, and J. F. Stebbins, "Natural Hydrous Amorphous Silica: Quantitation of Network Speciation and Hydroxyl Content by $^{29}$Si MAS NMR and Vibrational Spectroscopy," *Am. Mineral.*, 97, 203–211, **2012**.

[21] J. Klinowski, C.-F. Cheng, J. Sanz, J. M. Rojo, and A. L. Mackay, "Structural Studies of Tabasheer, an Opal of Plant Origin," *Philos. Mag. A*, 77, 1, 201–216, **1998**.

[22] R. Siegel, T. T. Nakashima, and R. E. Wasylishen, "Signal-to-Noise Enhancement of NMR Spectra of Solids Using Multiple-Pulse Spin-Echo Experiments," *Concepts Magn. Reson. Part A Bridg. Educ. Res.*, 26, 2, 62–77, **2005**.

[23] K. Schmidt-Rohr and H. W. Spiess, *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*, Acad. Press. Elsevier, **1994**.

[24] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, and Skelton; N. J., *Protein NMR Spectroscopy, Second Edition: Principles and Practice*, Academic Press. **2007**.

[25] M. Butusov and A. Jernelöv, *Phosphorus in the Organic Life: Cells, Tissues, Organisms*. **2013**.

[26] C. Godinot, M. Gaysinski, O. P. Thomas, C. Ferrier-Pagès, and R. Grover, "On the Use of $^{31}$P NMR for the Quantification of Hydrosoluble Phosphorus-Containing Compounds in Coral Host Tissues and Cultured Zooxanthellae," *Sci. Rep.*, 6, 21760, **2016**.

[27] F. Fayon, G. Le Saout, L. Emsley, and D. Massiot, "Through-Bond Phosphorus–Phosphorus Connectivities in Crystalline and Disordered Phosphates by solid-state NMR," *Chem. Commun.*, 16, 1702–1703, **2002**.

[28] C. Coelho, F. Babonneau, T. Azais, L. Bonhomm-Coury, J. Maquet, G. Laurent, and C. Bonhomme, "Chemical Bonding in Silicophosphate Gels: Contribution of Dipolar and J-Derived solid state NMR Techniques," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 40, 2–3, 181–189, **2006**.

[29] D. Bazin, X. Carpentier, O. Traxer, D. Thiaudière, A. Somogyi, S. Reguer, G. Waychunas, P. Jungers, and M. Daudon, "Very First Tests on SOLEIL Regarding the Zn Environment in Pathological Calcifications made of Apatite Determined by X-ray Absorption Spectroscopy," *J. Synchrotron Radiat.*, 15, 5, 506–509, **2008**.

[30] A. Kaflak-Hachulska, A. Samoson, and W. Kolodziejski, "$^{1}$H MAS and $^{1}$H-$^{31}$P CP/MAS NMR Study of Human Bone Mineral," *Calcif. Tissue Int.*, 73, 5, 476–486, **2003**.

[31] C. Jäger, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, and M. Epple, "A solid-state NMR Investigation of the Structure of Nanocrystalline Hydroxyapatite," *Magn. Reson. Chem.*, 44, 6, 573–580, **2006**.

[32] Y. Wang, S. Von Euw, F. M. Fernandes, S. Cassaignon, M. Selmane, G. Laurent, G. Pehau-Arnaudet, C. Coelho, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, T. Azaïs, and N. Nassif, "Water-Mediated Structuring of Bone Apatite," *Nat. Mater.*, 12, 12, 1144–53, **2013**.

[33] D. J. Kubicki, A. J. Rossini, A. Purea, A. Zagdoun, O. Ouari, P. Tordo, F. Engelke, A. Lesage, and L. Emsley, "Amplifying Dynamic Nuclear Polarization of Frozen Solutions by Incorporating Dielectric Particles," *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 44, 15711–8, **2014**.

[34] D. Sakellariou, G. Le Goff, and J.-F. Jacquinot, "High-Resolution, High-Sensitivity NMR of Nanolitre Anisotropic Samples by Coil Spinning," *Nature*, 447, 7145, 694–697, **2007**.

[35] H. Takahashi, D. Lee, L. Dubois, M. Bardet, S. Hediger, and G. De Paepe, "Rapid Natural-Abundance 2D $^{13}$C-$^{13}$C Correlation Spectroscopy Using Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Solid-State NMR and Matrix-Free Sample Preparation," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51, 47, 1–5, **2012**.

[36] V. Badilita, B. Fassbender, K. Kratt, A. Wong, C. Bonhomme, D. Sakellariou, J. G. Korvink, and U. Wallrabe, "Microfabricated Inserts for Magic Angle Coil Spinning (MACS) Wireless NMR Spectroscopy," *PLoS One*, 7, 8, **2012**.

# Chapitre 5 : Vers des synthèses en lien avec les conditions physiologiques responsables des calcifications pathologiques

**1. Etude de quelques chélatants de l'ion calcium ..... 207**
a) Synthèses en gel ..... 207
i. Nature chimique des gels ..... 208
ii. Protocole de synthèses ..... 209
iii. Morphologies obtenues ..... 209
iv. Analyses par FTIR et RMN $^{13}$C CP MAS ..... 213
b) Rôle des citrates ..... 214
i. Synthèses ..... 214
ii. Résultats : l'action des ions citrates durant les synthèses ..... 215
iii. Action des ions citrates (post-synthèses) sur les cristaux ..... 219
c) Interactions du thé vert avec les oxalates de calcium ..... 225
i. Composition chimique du thé : bibliographie et analyses par RMN $^{1}$H MAS et $^{13}$C CP MAS ..... 226
ii. Synthèses en présence de thé vert ..... 228
iii. Résultats expérimentaux ..... 229

**2. Croissance d'oxalates de calcium en surface d'hydroxyapatite ..... 234**
a) Synthèse de sphères micrométriques d'hydroxyapatite ..... 235
b) Résultats ..... 237
i. Les expériences de contrôle ..... 237
ii. Solution aqueuse d'ions oxalates ..... 238
iii. Solution aqueuse d'ions oxalates et citrates ..... 239
iv. Synthèse en présence d'extrait de thé vert ..... 241
v. Comparaison morphologique entre échantillons synthétiques et calculs rénaux ..... 242

**3. Synthèses en conditions microfluidiques ..... 247**
a) Contexte des travaux ..... 247
b) Résultats obtenus en synthèse microfluidique ..... 248

**4. Conclusion ..... 253**

# Chapitre 5: Vers des synthèses en lien avec les conditions physiologiques responsables des calcifications pathologiques

## 1. Etude de quelques chélatants de l'ion calcium

Lors de la formation de calculs rénaux, plusieurs types de molécules et de macromolécules (protéines, triglycérides…) peuvent s'intercaler entre les phases minérales (oxalates de calcium hydratés : COM, COD, et beaucoup plus rarement, COT – phosphates de calcium comme l'hydroxyapatite, ou autres comme la struvite... voir Chapitre 1). De telles molécules peuvent indéniablement jouer un rôle physico-chimique, en particulier au niveau de la croissance des phases minérales. Nous proposons dans cette partie l'étude de quelques molécules chélatantes du calcium pouvant être impliquées dans des changements structuraux. Il a été montré ([1], [2]) que des entités telles que l'ion citrate ($C_6H_5Na_3O_7$) ou l'EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) permettent une transformation de la phase COM en COD, en plus d'être des inhibiteurs à sa formation. Dans une première partie, nous montrerons l'effet de l'ajout de citrates sur : ***(i)*** la composition, ***(ii)*** la morphologie et, ***(iii)*** la cristallinité des oxalates de calcium formés. Une seconde partie sera consacrée à l'ajout d'extraits de thé vert. En effet, ce dernier est reconnu pour avoir un effet notable sur la morphologie de certains calculs rénaux [3], [4]. Nous développerons deux approches quant à l'influence des chélatants potentiels : ***(i)*** l'addition lors de la synthèse et, ***(ii)*** l'addition post-synthèse (c'est à dire sur des cristaux déjà formés). Dans le cas de cette dernière approche (point ***(ii)***), il faudra dans un premier temps synthétiser des cristaux de suffisamment grande taille afin d'étudier l'effet des chélatants sur la morphologie (et ce, sans les détruire complètement). Pour ce faire, nous aborderons la croissance d'oxalates de calcium dans différents gels et montrerons par là-même l'influence du milieu de croissance sur la morphologie des cristaux**.**

### a) Synthèses en gel

Les expériences de croissance en gel ont été initiées afin d'obtenir des cristaux d'oxalates de calcium de taille importante (de l'ordre de 200 à 300 µm, voire plus). Nous avons rapidement constaté que les morphologies observées par MEB étaient significatives d'affinités particulières entre les cristaux obtenus et les gels mis en jeu. D'un point de vue de la composition chimique, les gels suivants ont été utilisés : *agar-agar*, *gélatine de type A* et *gel de silice*. La densité des gels a été considérée comme un paramètre variable (de 0,5 à 10 % en masse).

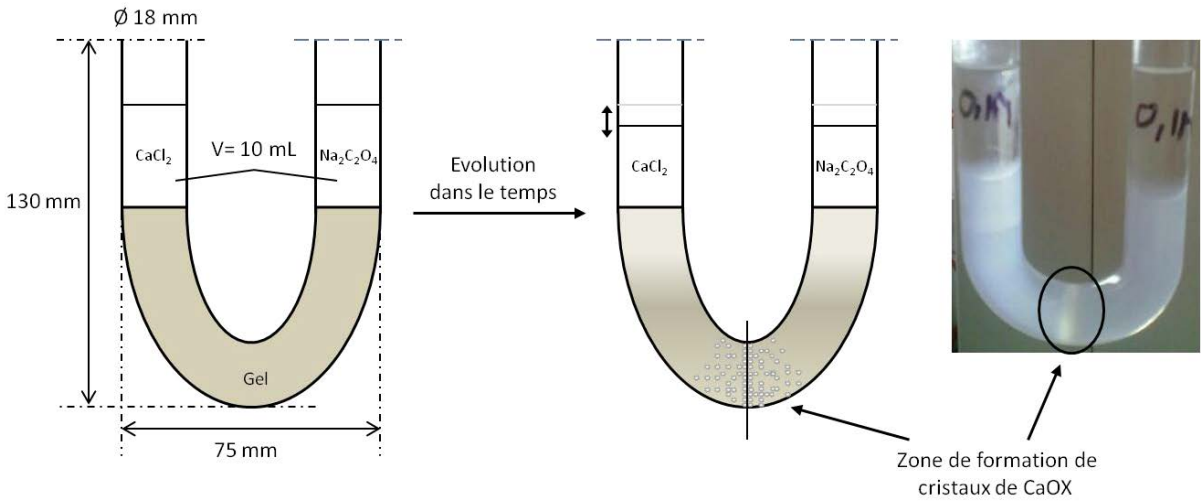



**Figure 5-1 : Schéma de synthèses en gel. Le cas présenté, sur le schéma comme sur la photo, correspond à une stœchiométrie Ca/Ox = 1 où les cristaux se forment au milieu du tube en U dans un gel d'agar-agar.**

### *i. Nature chimique des gels*

Au cours des expériences, nous avons utilisé trois gels distincts, et pour différentes densités :

- l'agar-agar (0,5 et 1,0 % en masse) (voir Figure 5-1)

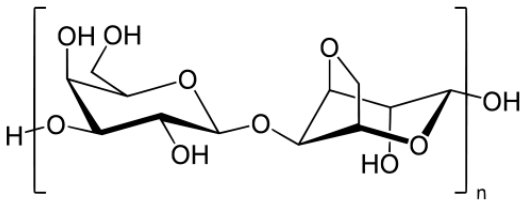



**Figure 5-2 : Formule de l'agar-agar.**

De la poudre d'agar-agar commerciale (Sigma) a été utilisée pour la fabrication du gel. Pour un gel à 0,5 % en masse, 0,150 g de poudre à été ajoutée à 30 mL d'eau (portée à ébullition). Ce mélange est ensuite placé dans un tube en U et mis à 4°C pendant une nuit.

- la gélatine de type A (1,0 ; 2,0 ; 5,0 et 10,0 % en masse)

La gélatine est un mélange complexe de protéines solubles dans l'eau, issues du collagène. Nous utilisons la gélatine commerciale (Sigma) de type A, issue de la peau de porc. Pour fabriquer un gel à 2,0 % en masse, 1,400 g de la gélatine commerciale (Sigma) est mélangée à 70 ml d'eau chauffée à 60°C. Le mélange est ensuite placé dans un tube en U et mis à 4°C pendant une nuit. Le pourcentage massique de gélatine introduit a une influence notable sur la "force" du gel ainsi synthétisé et donc sur l'enchevêtrement polymérique relatif au réseau.

- le gel de silice (~ 40 % en masse)

Le gel a été préparé à partir de métasilicate de sodium pentahydraté (Sigma-Aldrich). 19,45 g ont été dilués dans 45 mL d'eau. Une solution d'acide acétique (3 M) est alors ajoutée à la solution de silicates préparée au préalable de façon à atteindre un pH = 5,5. On place environ 30 mL du mélange ainsi obtenu dans un tube en U puis on laisse au repos pendant une journée à température

ambiante. La manipulation effectuée ici a été adaptée du travail de Joshi *et coll.* [5]. Notons toutefois que les cristaux analysés dans cette publication ne correspondent pas à la phase COM (comme annoncé) mais à un hydrogéno-oxalate de sodium monohydraté, de formule $NaHC_2O_4 \cdot H_2O$. Cette phase a été complètement caractérisée par DRX et par RMN ($^{1}H$, $^{13}C$, $^{23}Na$) en phase solide (voir Chapitre 3 partie 1 b) ii.).

### *ii. Protocole de synthèses*

A chaque extrémité d'un tube en U contenant le gel considéré, 10 ml d'un précurseur de calcium ou d'oxalate ont été placés : il s'agit de $CaCl_2$ pour le calcium et $Na_2C_2O_4$ pour l'oxalate (une synthèse a également été conduite avec $H_2C_2O_4$ afin de reproduite la synthèse effectuée par Joshi *et coll.* [5]). Les tubes en U ont ensuite été maintenus à température ambiante. Par diffusion lente, les précurseurs se rencontrent dans la partie basse des tubes conduisant à la cristallisation des phases minérales. Les cristaux ont été récupérés de 4 à 6 semaines après le début de la synthèse. Les concentrations choisies initialement ont été volontairement portées à $[Ca^{2+}] = [C_2O_4^{2-}] = 0{,}1$ mol.L$^{-1}$. Une synthèse en présence d'un excès de calcium a également été effectuée à titre de comparaison ($[Ca^{2+}] = 1{,}0$ ou $2{,}0$ mol.L$^{-1}$ et $[C_2O_4^{2-}] = 0{,}1$ mol.L$^{-1}$. Les cristaux obtenus sont alors lavés à l'eau et à l'éthanol puis analysés par FTIR, RMN et MEB. L'analyse par DRX n'a pas été envisagée afin de ne pas détruire les cristaux par broyage. La récupération des cristaux a été une étape importante et a été adaptée en fonction du type de gel utilisé. Ainsi, dans le cas de l'agar-agar, la zone de forte cristallisation a été extraite puis immergée dans de l'eau portée à environ 90°C. Une filtration à chaud a directement été effectuée à la suite. Dans le cas de la gélatine de type A, le tube en U a été chauffé au bain-marie puis une filtration sous vide a été effectuée. Pour le gel de silice, la zone d'intérêt a été extraite puis le gel a été laissé à l'air libre. Après quelques jours, un gel sec est obtenu sous forme de poudre et les cristaux ont été triés. Expérimentalement, la gélatine de type A s'est avérée être l'option la plus simple dans le cadre de notre étude. La récolte des cristaux dans les deux autres milieux de synthèse n'a pas toujours permis d'obtenir des cristaux totalement exempts de traces de gel. Entre 0,025 g et 0,060 g de cristaux sont classiquement récoltés lors des ces expériences.

A la suite de ces expériences préliminaires, l'extrait de thé vert a été ajouté avec l'un ou l'autre des précurseurs mais également dans le gel. A noter que toutes les expériences ont été conduites avec le même échantillon commercial de feuilles de thé vert.

### *iii. Morphologies obtenues*

De par leur nature, les différents gels utilisés ne vont pas interagir identiquement vis-à-vis des solutions de précurseurs. Dans les trois situations présentées ici (agar-agar, gélatine de type A, gel de silice), les cristaux obtenus sont de taille micrométrique (entre 20 et 300 µm).

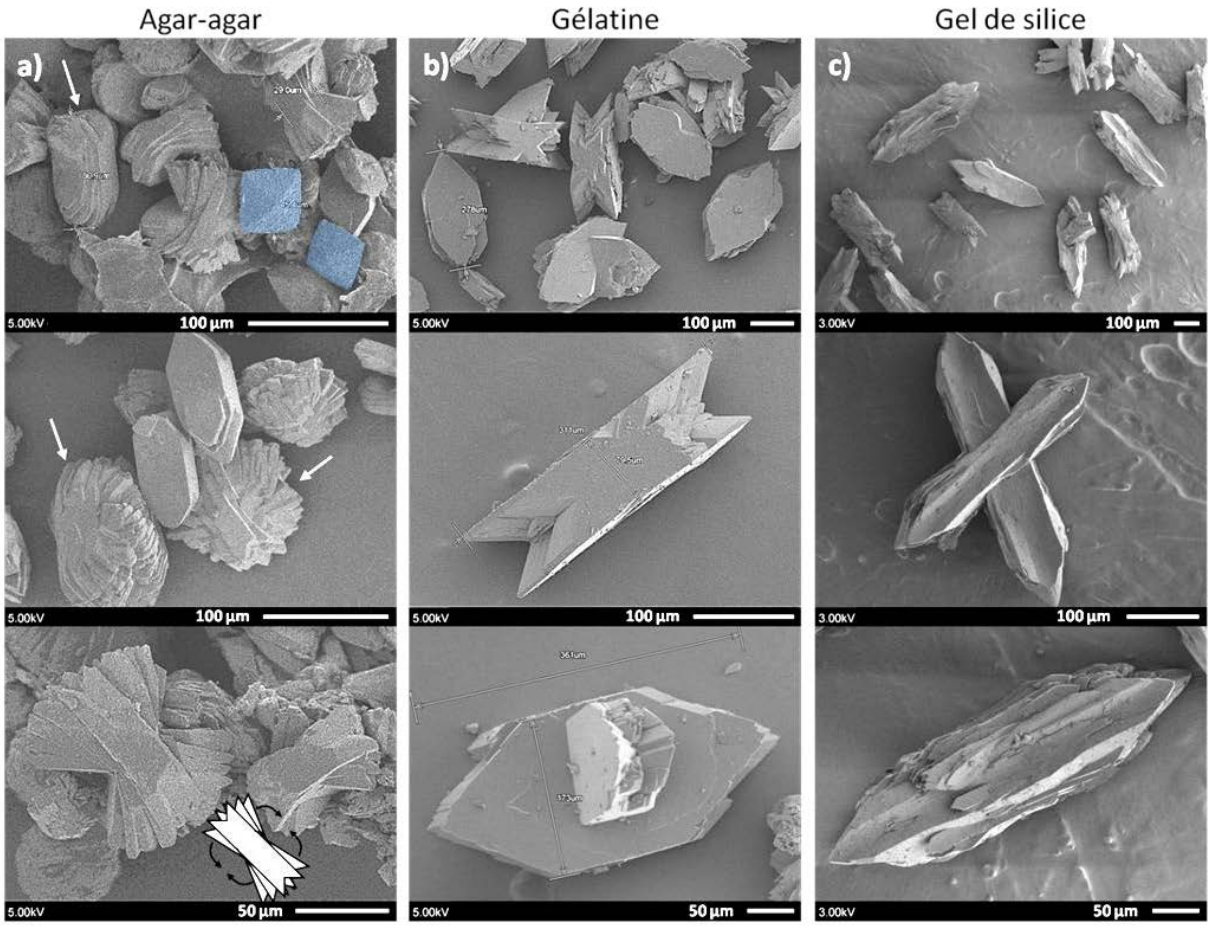



**Figure 5-3 : Images MEB des cristaux obtenus par croissance en gel. a) cristaux obtenus dans l'agar-agar (0,5 % en masse). Des cristaux de COD sont soulignés en bleu. b) cristaux obtenus dans la gélatine (1,0 % en masse). c) cristaux obtenus dans un gel de silice (40 % en masse).**

La Figure 5-3 permet de comparer les morphologies obtenues dans différents gels pour des conditions initiales identiques ($[Ca^{2+}] = [C_2O_4^{2-}] = 0{,}100$ mol.L$^{-1}$). Dans les trois cas, nous obtenons des cristaux d'oxalates de calcium de l'ordre de 100 µm. Dans l'agar-agar (0,5 %), on remarque une hétérogénéité au niveau des cristaux obtenus (Figure 5-3a). On peut en effet observer des cristaux bipyramidaux (en bleu) clairement associés à une morphologie caractéristique du COD (voir Chapitre 1). En ce qui concerne le COM, deux types de morphologies sont mis en évidence : ***(i)*** des cristaux en forme de "pince à linge" (déjà observés lors des synthèses en goutte à goutte – voir Chapitre 1) et ***(ii)*** des cristaux en forme de "pelotes" (flèches blanches sur la Figure 5-3a). Dans le cas particulier de la synthèse en milieu agar-agar, les cristaux obtenus sont de tailles beaucoup plus importantes (par rapport aux synthèses en goutte à goutte). D'après les travaux de Backov *et coll.* [6], ces assemblages peuvent être attribués à un phénomène de croissance homo-épitaxiale sur la face (100) des cristaux. Le schéma en bas de la Figure 5-3a propose un mécanisme de formation pour ces cristaux. D'une certaine manière, nous sommes en présence de morphologies comparables à celles rencontrés lors de l'analyse de certaines calcifications pathologiques (voir Figure 5-4).

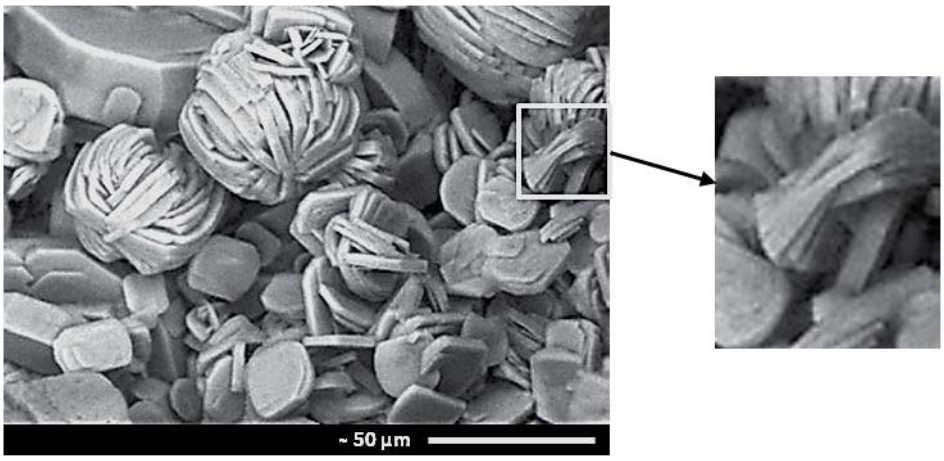



Figure 5-4 : Image MEB d'un calcul rénal d'un patient souffrant d'hyperoxalurie primaire de type 1. D'après [7].

Ce type d'agglomération de cristaux en épitaxie, qui forme des « pelotes » est typique d'hyperoxalurie primaire de type 1, une maladie génétique [7]. La croissance épitaxiale de cette phase de COM est probablement induite par une ou plusieurs macromolécules typiques de la maladie en question (hyperoxalurie primaire de type 1). Ces macromolécules semblent entrainer un désordre dans le réseau cristallin qui induit la croissance épitaxiale.

En ce qui concerne la synthèse dans la gélatine de type A (1,0 % en masse) (Figure 5-3b), les cristaux sont plus homogènes en ce qui concerne leur morphologie. Celle-ci est classique et caractéristique du COM (« pince à linge »). On peut noter toutefois quelques croissances épitaxiales. La Figure 5-3c montre les cristaux synthétisés dans le gel de silice (40 % en masse). On retrouve une fois encore des cristaux de COM bien identifiés. Néanmoins, ceux-ci présentent une morphologie particulière, allongée et concave sur la face (100). Les résultats obtenus étant donc différents d'un gel à l'autre, nous avons entrepris une étude de l'influence de la densité des gels. Sachant que la gélatine est facilement manipulable (voir ci-dessus), nous avons choisi d'étudier l'effet de la densité dans le cas de ce gel en particulier.

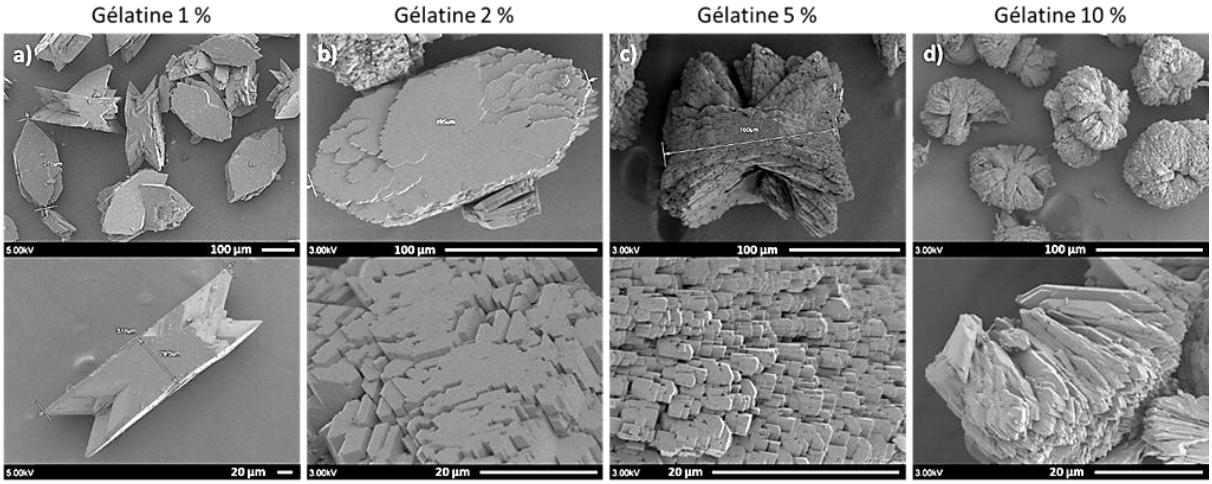



Figure 5-5 : Images MEB de cristaux de COM synthétisés dans la gélatine de type A à différentes densités. a) 1,0 %. b) 2,0 %. c) 5,0 %. d) 10,0 %.

Les conditions initiales de synthèses des cristaux présentés sur la Figure 5-5 sont identiques à celles mises en jeu dans le cas des cristaux présentés sur la Figure 5-3. Cependant, les cristaux synthétisés

dans la gélatine de type A à 2,0 ; 5,0 et 10,0 % (Figure 5-5b, 5c et 5d) ont été récoltés deux semaines après ceux présentés sur la Figure 5-5a (gélatine à 1,0 %). On observe des tailles équivalentes pour les cristaux. Plus le % en masse augmente, plus la croissance hétérogène semble également importante. On note également une "rugosité" au niveau des faces cristallines (voir en particulier la Figure 5-5b). On considère ces cristaux comme des mésocristaux décrits par Cölfen *et coll.* [8]. Nindiyasari *et coll.* avancent une explication à ce phénomène dans une récente publication, dans le cas de la croissance de carbonate de calcium en présence de gélatine [9]**.** En effet, les auteurs supposent que la densité du gel change la diffusivité des solutions et donc localement les conditions physicochimiques pour la croissance des cristaux. On passe donc d'une cristallisation classique couche par couche à la formation de mésocristaux en augmentant la densité du gel. La probabilité d'incorporation de la matrice dans les cristaux augmente également ce qui multiplie les décalages dans l'assemblage des sous-unités. Ces phénomènes expliquent en partie les morphologies plus complexes obtenues à plus grande densité de gel.

Après avoir obtenu des cristaux de COM de grande taille, nous avons tenté d'étendre l'approche à la synthèse de cristaux de COD. En s'inspirant des conditions physiologiques permettant l'obtention de COD (cf hypercalciurie, voir Chapitre 1), il a été décidé d'augmenter la concentration en ions $Ca^{2+}$ dans la solution précurseur. La solution d'oxalates n'est pas modifiée (*i.e.* $[C_2O_4^{2-}] = 0{,}100$ mol.$L^{-1}$ et la concentration de la solution d'ions calcium est portée à $[Ca^{2+}] = 2{,}000$ mol.$L^{-1}$). Le gel utilisé est la gélatine de type A à 2,0 et 10,0 % en masse. Les cristaux sont récoltés 6 semaines après le début de la synthèse. La quantité de cristaux récoltés est alors 4 fois supérieure à celle obtenue lors de la synthèse en concentration plus faible en $Ca^{2+}$ (0,12 g dans ce cas-ci). Ces derniers ne se forment plus à équidistance des deux solutions (c'est-à-dire dans le bas du tube en U) mais du côté de la solution d'oxalates, les ions $Ca^{2+}$ ayant manifestement migrés plus rapidement.

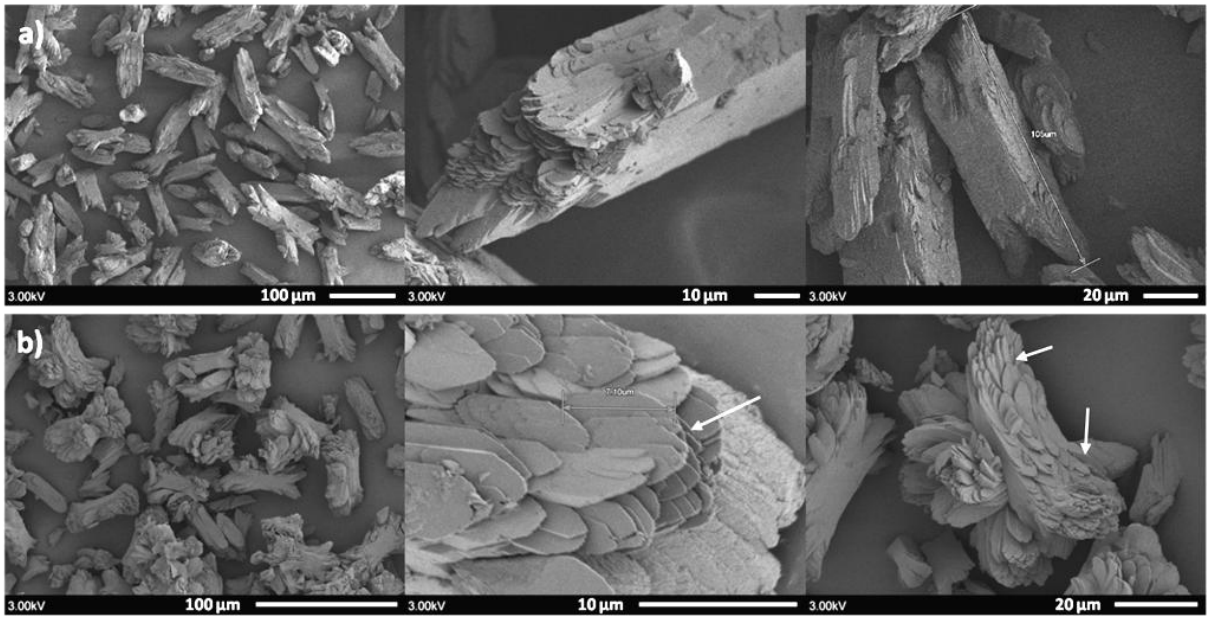



**Figure 5-6 : Images MEB de cristaux de COM synthétisés en excès d'ions calcium dans la gélatine de type A pour différents % en masse. a) 2,0 %. b) 10,0 %.**

La densité du gel joue un rôle sur la croissance hétérogène. Outre la taille des cristaux, qui semble plus importante pour le gel le moins concentré (environ 100 µm, Figure 5-6a et environ 50 µm, Figure 5-6b), la morphologie évolue également, les cristaux obtenus correspondent à la phase COM,

et non pas à la phase COD, comme attendu. On remarque une croissance épitaxiale plus caractérisée dans le gel le plus concentré. Les cristaux de COM qui croissent sur les faces (100) ont des tailles d'environ 10 µm (flèches blanches sur la Figure 5-6b). On observe également quelques cristaux présentant une croissance sur les faces (010) (Figure 5-6 b, dernière image). L'information la plus importante à retenir ici est l'échec à synthétiser des cristaux de COD de grande taille. Sans effectuer un plan d'expériences (analyses multivariables) prenant en compte les paramètres de synthèse pour le COD, il semble difficile de converger vers des conditions de synthèse satisfaisantes. C'est pourquoi, comme nous le verrons dans la suite, nous avons essayé d'incorporer aux gels (ou aux solutions de départ) des agents chélatants des ions calcium – voir paragraphes 1.b).i et 1.b).iii.

### *iv. Analyses par FTIR et RMN $^{13}$C CP MAS*

A la suite de l'étude de la morphologie des cristaux, nous avons ensuite rapidement analysés ceux-ci par spectroscopies FTIR et RMN ($^{13}$C CP MAS). Bien que les morphologies observées par MEB permettent de caractériser les phases majoritaires (comme étant COM ou éventuellement COD selon la synthèse), il nous est apparu important d'aller plus avant dans la caractérisation de celles-ci *via* l'enregistrement de signatures spectroscopiques.

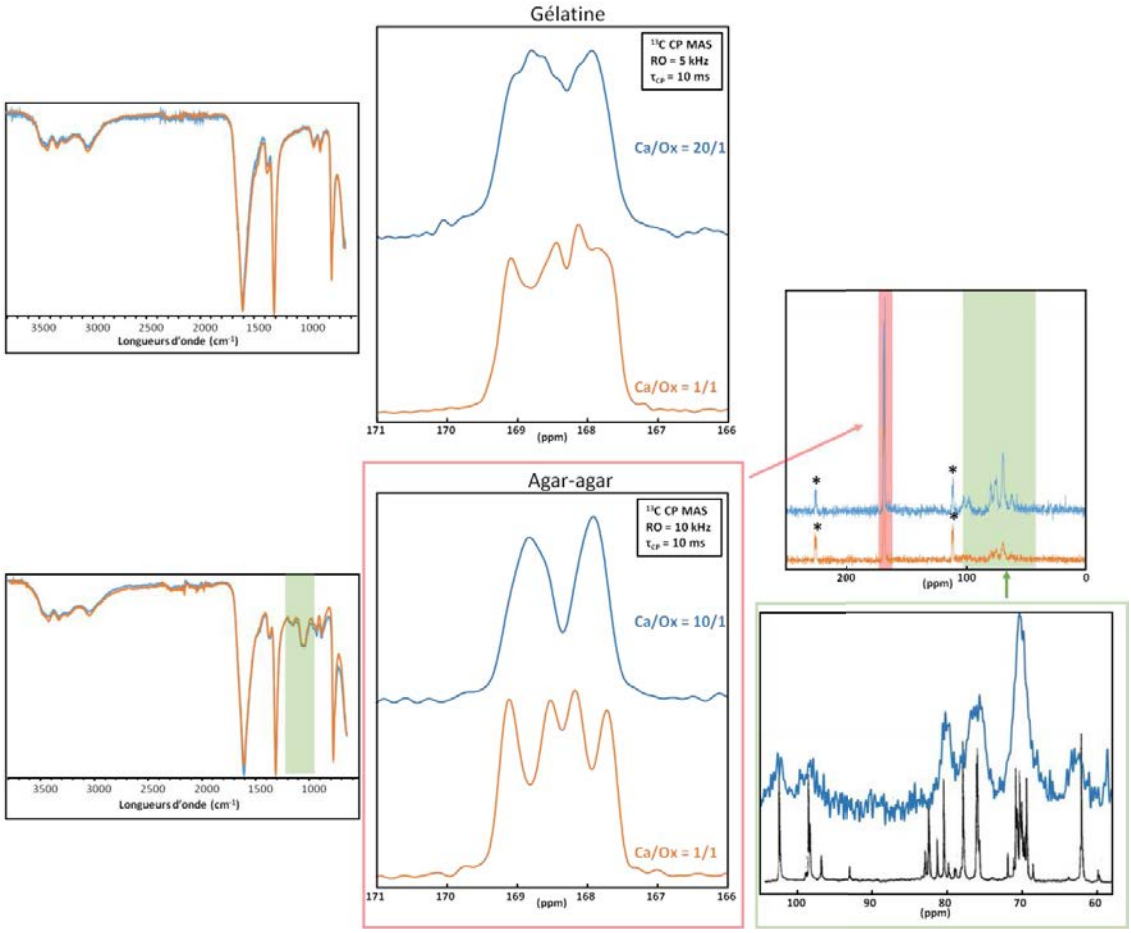



**Figure 5-7 : Spectres RMN $^{13}$C CP MAS des cristaux d'oxalates de calcium synthétisés en tube en U. En haut : dans la gélatine de type A, en bas : dans l'agar-agar. RO : fréquence de rotation MAS (kHz). Les fréquences de rotation sont maintenues à des valeurs faibles de façon à ne pas induire de modifications structurales (voir Chapitre 3). $\tau_{CP}$ : temps de contact (ms). Les spectres représentés en bleu correspondent à une synthèse en présence d'excès de calcium (hypercalciurie) alors que les spectres représentés en orange correspondent à une synthèse dans un rapport stœchiométrique. Les zones indiquées en vert sur les spectres $^{13}$C CP MAS et FTIR soulignent la présence d'une certaine quantité résiduelle de gel. Le spectre en noir (en bas à droite) est issu de [10] et correspond à l'agarose.**

La Figure 5-7 permet de comparer quatre types de synthèses (gel à base d'agar-agar ou de gélatine de type A ; conditions d'hypercalciurie ou non). Comme décrit ci-dessus, ce gel étant difficile à séparer des cristaux, on remarque une certaine contamination résiduelle. Les signaux observés par FTIR (entre 1220 et 980 $cm^{-1}$) et les pics observés par RMN $^{13}C$ CP MAS (entre 30 et 100 ppm) - mis en évidence en vert sur la Figure 5-7, permettent de caractériser les molécules d'agar-agar. Dans le cas de la gélatine de type A, aucun signal attribué au gel n'est détectable, que ce soit par FTIR ou par RMN $^{13}C$ CP MAS. Pour les quatre synthèses présentées sur la Figure 5-7, la phase COM est clairement mise en évidence (voir Chapitre 1). En condition stœchiométrique (Ca/Ox = 1/1), les spectres $^{13}C$ CP MAS sont compatibles avec la structure cristallographique du COM, de groupe d'espace **$P2_1/n$**, présentant quatre sites $^{13}C$ inéquivalents dans l'unité asymétrique. On remarque que dans le cas de la gélatine de type A, le spectre $^{13}C$ CP MAS est quelque peu distordu : nous attribuons ces distorsions à des distributions de déplacement chimique – voire à la présence d'une composante moins bien cristallisée (voir Chapitre 3 partie 1 a) ii.). Cette observation est particulièrement nette dans le cas des cristaux obtenus en condition d'hypercalciurie. Des raies de résonance beaucoup plus larges sont alors mises en évidence.

### b) Rôle des citrates

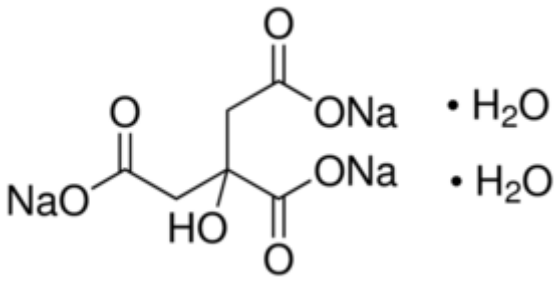



**Figure 5-8 : Formule du citrate de sodium dihydraté (schéma du catalogue Sigma-Aldrich).**

Les ions citrates sont reconnus comme étant des chélatants des cations $Ca^{2+}$. D'après de nombreux travaux [1], [11], [12], les citrates jouent un rôle d'inhibiteur de la formation du COM (mais également de l'hydroxyapatite, HAp). Les citrates ont également une influence certaine sur la morphologie des cristaux de COM, présentant une affinité particulière pour certaines faces : (-101) et (010) [13]. Du fait de l'inhibition renforcée de ces faces, la croissance est amenée à se poursuivre dans d'autres directions. D'un point de vue physiologique et clinique, l'hypocitraturie semble être un facteur aggravant de la lithiase urinaire [14]. Dans le rein, la charge filtrée de citrates est de 17 ± 5 mM, quotidiennement. Le citrate sanguin, totalement ionisé, est filtré par le glomérule. Cependant, l'excrétion quotidienne de citrate représente seulement 10 à 30 % des citrates filtrés par le glomérule. Cela est dû à la compétition entre réabsorption et sécrétion. Dans la mesure où les ions citrates jouent un rôle prépondérant dans la formation de calcifications pathologiques, il est donc logique de s'y intéresser ici.

#### *i. Synthèses*

Le citrate de sodium dihydraté (voir Figure 5-8) est utilisé comme source d'ions citrates. En ajustant la valeur du pH de la solution, il est possible de contrôler le nombre de fonctions chélatantes de cette molécule (0, 1, 2 ou 3), les trois pKa étant 3,14 ; 4,76 et 6,40, respectivement.

Dans un premier temps (paragraphe *ii.* ci-dessous), les ions citrates ont été introduits dans la solution contenant le précurseur de calcium, et ce, 2 heures environ avant les synthèses. Il en résulte une chélation initiale des ions calcium. La concentration en $CaCl_2$ a été fixée à 0,010 M, celle du précurseur d'oxalates ($Na_2C_2O_4$) à 0,010 M. Le rapport $[Ca^{2+}]/[citrates]$ a été considéré comme une variable (= 1,0 et 3,0). Les mélanges ($CaCl_2$ + citrate de sodium) ainsi que la solution de $Na_2C_2O_4$ ont ensuite été ajoutés par double goutte à goutte. Une analyse de vieillissement a été effectuée sur une période de 6 jours, après addition.

Dans une seconde partie, nous avons utilisé des cristaux de COM synthétisés comme précédemment (voir paragraphe 1.a).ii.), et de taille supérieure à 10 µm. Ces derniers ont alors été immergés dans une solution aqueuse (2 à 3 mL) de citrate de sodium (0,100 $mol.L^{-1}$). En parallèle, d'autres cristaux sont plongés dans de l'eau et de l'éthanol de façon à avoir des points de comparaison clairs. Les cristaux sont immergés durant 24 heures, avant d'être retirés et séchés à l'air libre en vue d'analyses complémentaires.

### *ii. Résultats : l'action des ions citrates durant les synthèses*

Les poudres obtenues lors de cette première série d'expériences ont été analysées par FTIR, DRX, MEB et RMN.

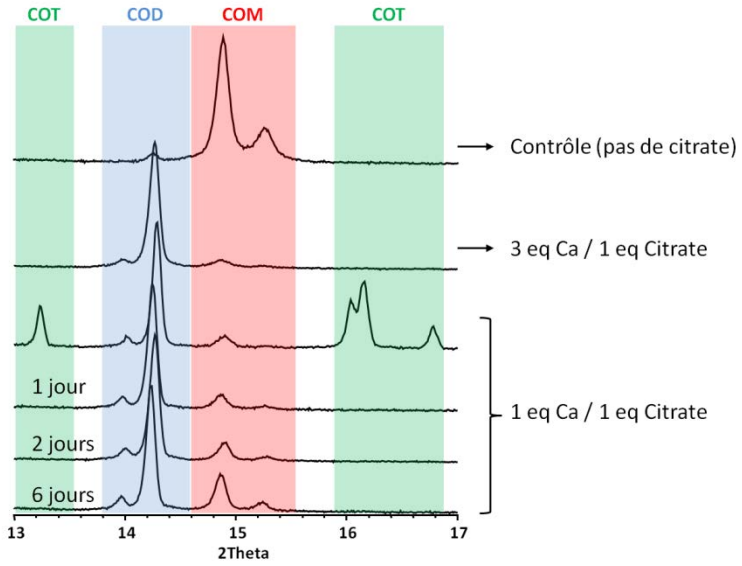



**Figure 5-9 : Diffractogrammes des échantillons synthétisés en présence d'ions citrates. Le diffractogramme correspondant à la synthèse de contrôle (absence de citrates) est présenté en haut de la figure. Les zones rouge, bleue et verte correspondent aux pics de diffraction caractéristiques du COM, COD et COT, respectivement. $[Ca^{2+}]/[citrates]$ = 3,0 et 1,0.**

La Figure 5-9 présente les diffractogrammes obtenus pour les expériences décrites ci-dessus ($2\theta$ = 13-17°). La synthèse de contrôle permet de vérifier que la phase majoritaire obtenue est le COM (on remarque néanmoins la présence d'une impureté de COD minoritaire). Lorsqu'on introduit les ions citrates, les phases majoritaires deviennent le COD et le COT (au détriment du COM). On peut remarquer la présence de la phase COT en fin de synthèse et lorsque $[Ca^{2+}]/[citrates]$ = 1. On notera que les pics de diffraction de COM et COD présentent un léger décalage du fait de la technique particulière mise en œuvre pour enregistrer les diffractogrammes en présence d'une quantité restreinte de poudre : les échantillons sont placés au centre d'une plaque de verre,

elle-même mise dans un porte échantillon classique ; la plaque de verre est rehaussée pour être à la bonne distance du faisceau grâce à de la pâte à modeler. Une étude du vieillissement a été effectuée pour $[Ca^{2+}]/[citrates] = 1$. La disparition complète du COT et l'apparition du COM sont clairement mises en évidence. L'augmentation des pics de diffraction attribués au COM peut être attribuée à : ***(i)*** une transformation partielle de COD et COT en COM (cf instabilité des phases di- et trihydratées), ***(ii)*** une transformation d'une phase amorphe ACO (voir Chapitre 1) pouvant avoir été formée en présence de d'ions citrates. Bien entendu une phase de type ACO est difficilement détectable par DRX sur poudre.

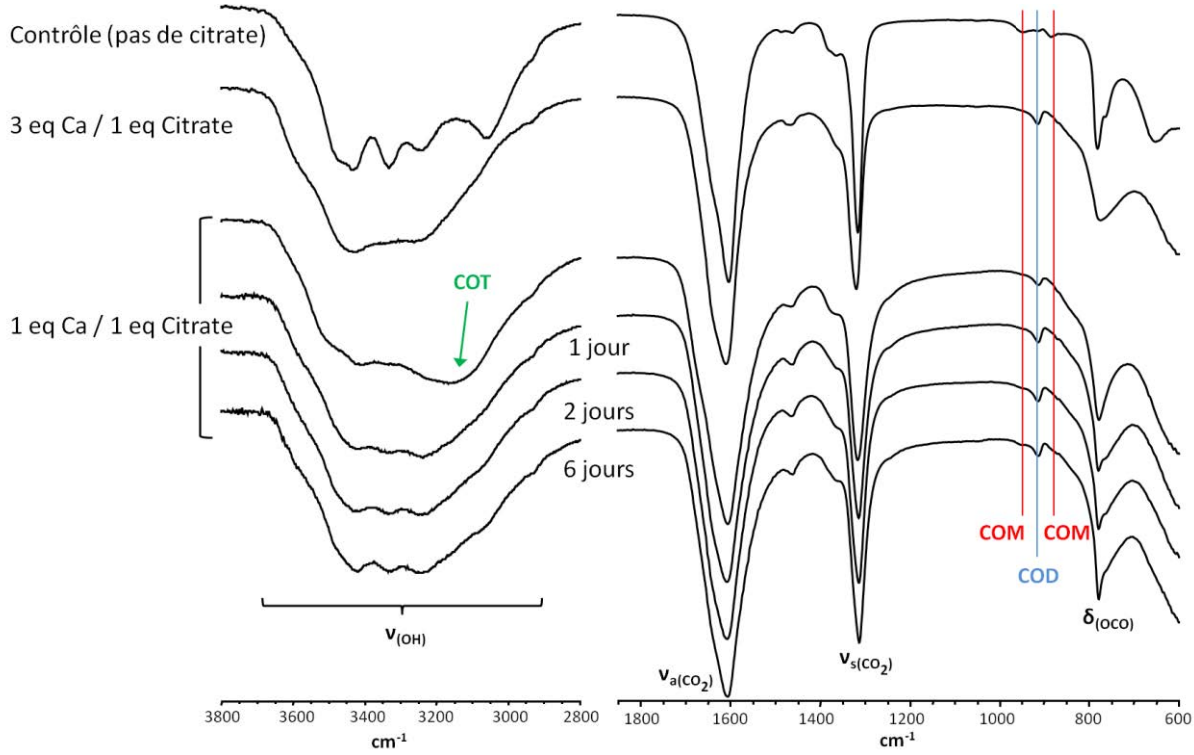



**Figure 5-10 : Spectres FTIR des échantillons synthétisés en présence d'ions citrates. Le spectre FTIR de la synthèse de contrôle (sans citrates) est présenté en haut de la figure. $[Ca^{2+}]/[citrates] = 3,0$ et 1,0.**

Les spectres FTIR présentés sur la Figure 5-10 vont dans le sens des résultats obtenus par DRX. La zone des élongations $\nu_{(OH)}$ (3800-2800 cm$^{-1}$) est particulièrement caractéristique des différentes phases d'oxalate hydraté. Le spectre du composé de contrôle présente les 5 signaux attendus pour le COM dans cette zone (voir Chapitre 1). Pour $[Ca^{2+}]/[citrates] = 1$, et immédiatement après la synthèse, le massif caractéristique du COT est bien mis en évidence (signal large vers 3100 cm$^{-1}$). Au cours du vieillissement, la structuration croissante du massif $\nu_{(OH)}$ s'accompagne de l'augmentation relative de la quantité de COM (voir les analyses par DRX présentées sur la Figure 5-9). Pour $[Ca^{2+}]/[citrates] = 3$, un spectre typique du COD est observé. Les signaux à 945 et 885 cm$^{-1}$ (traits rouges sur la Figure 5-10) sont également caractéristiques du COM ; quant au signal à 917 cm$^{-1}$ (trait bleu), il est attribué au COD. La présence d'un signal fin (à 778 cm$^{-1}$) de plus en plus intense est également caractéristique du COM ($[Ca^{2+}]/[citrates] = 1$).

Les poudres ayant été correctement analysées et identifiées par DRX et FTIR, il est apparu intéressant d'étudier les morphologies obtenues par ajouts de citrates, ainsi que leur évolution au cours du temps. Après métallisation à l'or (20 nm) les différents échantillons ont été observés par MEB.

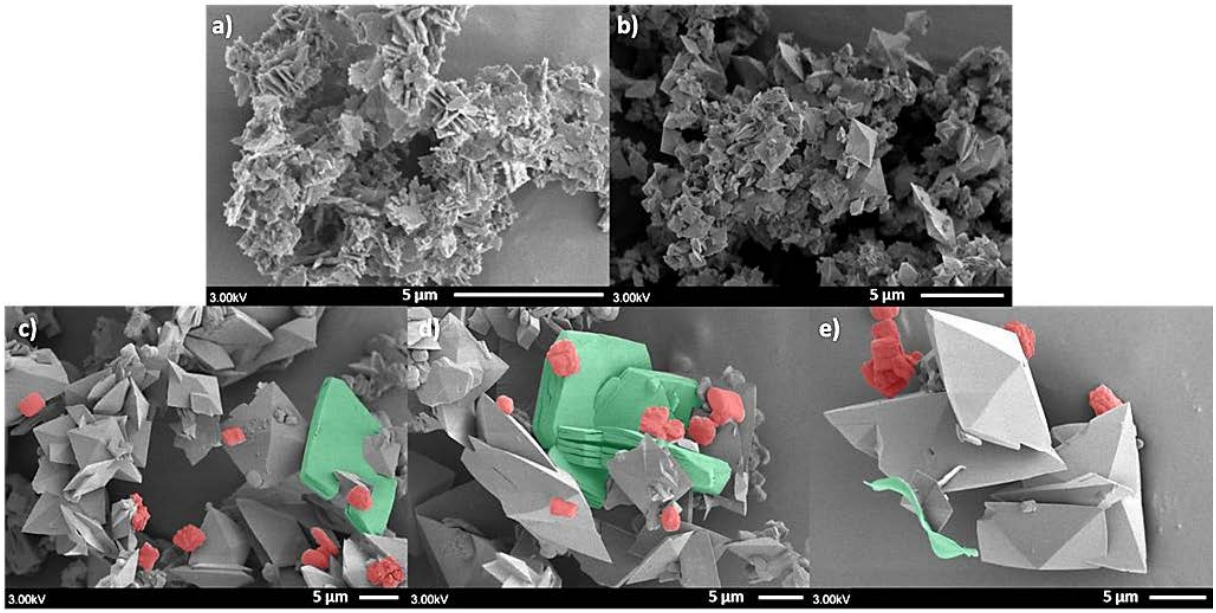



**Figure 5-11 : Images obtenues par MEB. a) synthèse de contrôle (en absence de citrates). b) [$Ca^{2+}$]/[citrates] = 3. c), d) et e) [$Ca^{2+}$]/[citrates] = 1. En rouge : cristaux pouvant correspondre au COM ou ACO. En vert : cristaux de COT (assemblages de feuillets).**

L'image MEB relative à la synthèse de contrôle présente une morphologie tout à fait originale du COM (cristaux "dentelés" de petite taille, << 5 µm). *A priori*, une telle morphologie n'a pas été observée auparavant. Sur la Figure 5-11b ([$Ca^{2+}$]/[citrates] = 3), des cristaux micrométriques de COD sont parfaitement mis en évidence. On remarque également la morphologie en cristaux "dentelés" pouvant être assimilée à du COM (ou ACO), et ce, minoritairement. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus par DRX et FTIR. L'influence des citrates est donc ici évidente, orientant la cristallisation vers la formation de COD, en lieu et place du COM. Pour [$Ca^{2+}$]/[citrates] = 1 (Figure 5-11c, 11d et 11e), plusieurs observations peuvent être faites : ***(i)*** des cristaux de COD de grande taille (> 10 µm) sont mis en évidence, ***(ii)*** des cristaux de COT (empilements caractéristiques de plaquettes, en vert) sont également présents, ***(iii)*** on remarque enfin des agglomérats de petite taille (soulignés en rouge sur les Figures correspondantes). Les particules constituant ces assemblages n'ont pas de forme bien définie. Compte-tenu des données de DRX (Figure 5-9), il est probable que ces agglomérats correspondent à une phase de type COM ou ACO (cristallisant au cours du temps pour donner la quantité de COM observé en DRX après 6 jours).

Par DRX, il a été démontré ci-dessus que le vieillissement des solutions avait un effet important dans le cas [$Ca^{2+}$]/[citrates] = 1. La Figure 5-12 présente des images MEB obtenues au cours du temps, sur une période de temps de 1 à 6 jours pour ce rapport [$Ca^{2+}$]/[citrates] = 1.

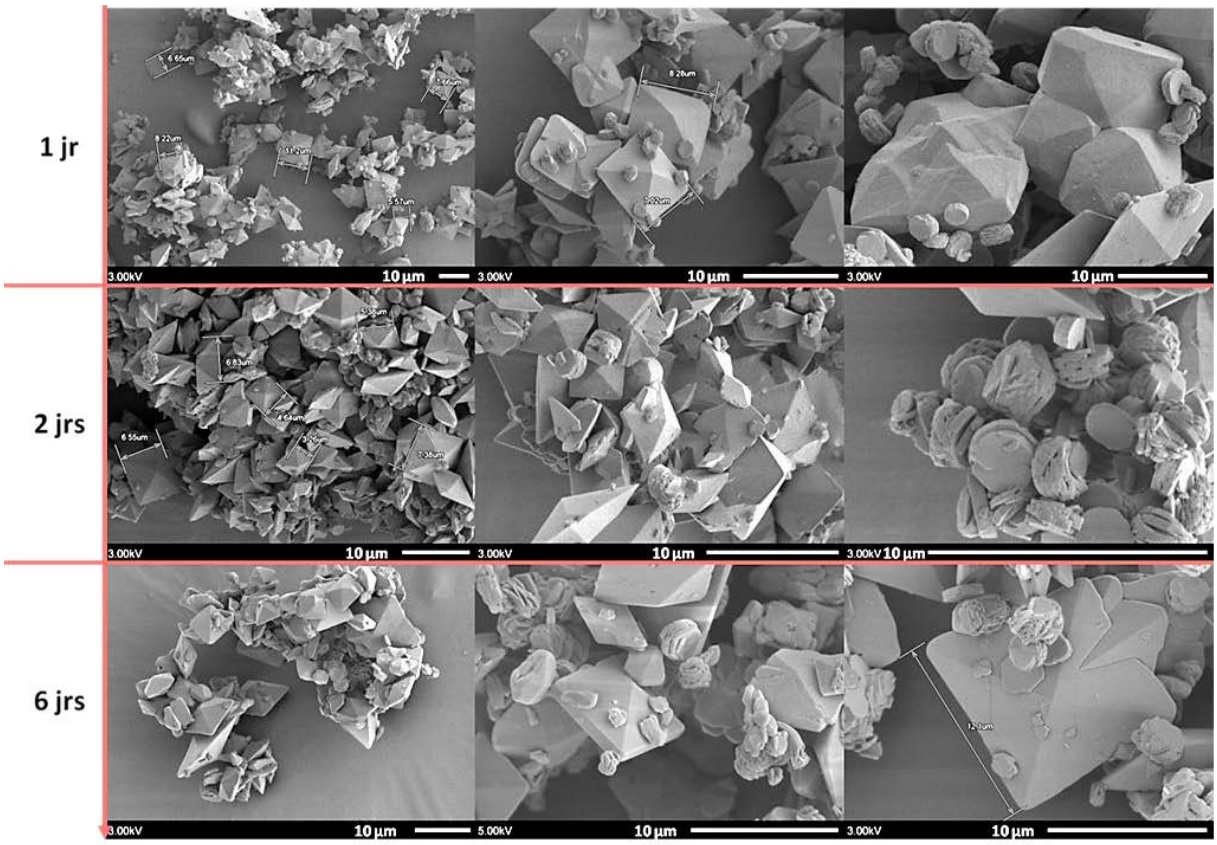



**Figure 5-12 : Images obtenues par MEB : échantillons d'oxalates synthétisés en présence d'ions citrates, $[Ca^{2+}]/[citrates] = 1$ en fonction du vieillissement (1 à 6 jours).**

On observe clairement : ***(i)*** la disparition des agglomérats de particules présentés ci-dessus (en rouge) sur la Figure 5-11 au profit de l'apparition progressive de plaquettes agglomérées typiques de la phase COM. On peut rapprocher cette morphologie de celle observée sur la Figure 5-3a. L'augmentation au cours du temps de la quantité de cristaux de COM est en accord avec les observations par DRX (Figure 5-9), ***(ii)*** la présence de gros cristaux de COD (bipyramides) dont la taille semble augmenter au cours du temps.

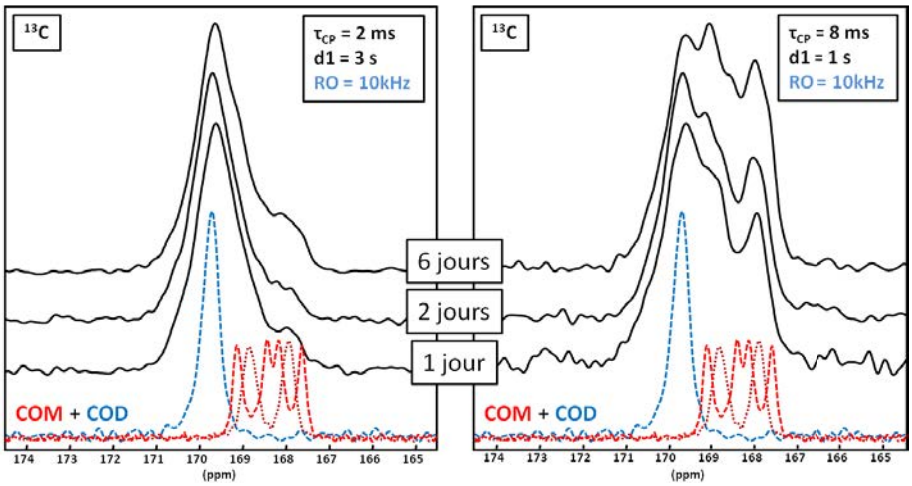



**Figure 5-13 : Spectres RMN $^{13}$C CP MAS des échantillons d'oxalates de calcium hydratés synthétisés en présence d'ions citrates pour [$Ca^{2+}$]/[citrates] = 1. L'étude est effectuée en fonction du vieillissement (de 1 à 6 jours). Les spectres du COD (en bleu) et du COM (en rouge et « ACO » type en rouge sombre) obtenus par synthèse classique (voir Chapitre 3) sont rappelés pour comparaison. $\tau_{CP}$ : temps de contact (ms), d1 : délai de relaxation pour $^{1}$H (s), RO : fréquence de rotation MAS (kHz).**

Les spectres obtenus par RMN $^{13}$C CP MAS à fréquence modérée sont présentés sur la Figure 5-13. On remarque tout d'abord que des spectres complexes sont obtenus. Compte tenu des déplacements chimiques isotropes observés, les résonances correspondent à la superposition des contributions de phases COM et COD. Assez curieusement, il est possible d'éditer, au moins partiellement, les deux contributions. D'une part, en diminuant le délai de relaxation $^{1}$H (ici 1 s), la phase COM est surestimée par rapport à la phase COD. Lorsque ce délai de relaxation est fixé à 3 s, la phase COD est clairement mise en avant. On notera également l'importance de la valeur du temps de contact, $\tau_{CP}$. L'augmentation de celui-ci tend à favoriser l'observation de la phase COM. Dans le Chapitre 1, nous avons présenté des spectres aux $\tau_{CP}$ optimisés, de 8 à 10 ms pour les trois phases d'oxalate de calcium hydraté. La Figure 5-13 montre pourtant un signal pour le COD très intense avec $\tau_{CP}$ = 2ms. La comparaison des largeurs de raie obtenues avec celles décrites dans le Chapitre 3 pour les phases COM et COD de référence est intéressante également. L'ajout d'ions citrates conduit clairement à des résonances plus larges, aussi bien pour le COM que pour le COD. L'effet est tout particulièrement marqué dans le cas du COD. Cet élargissement peut être attribué à une distribution de déplacements chimiques $^{13}$C au sein de la structure zéolithique. Le diamètre des canaux dans la zéolite (COD) est de l'ordre de 4,5 Å. Il est possible qu'un ion tel que le citrate (~ 7 Å de long et 3,5 Å au plus large de la molécule) puisse rentrer à l'intérieur des canaux. Un tel élargissement du signal correspond normalement à une augmentation du désordre dans la structure du composé, or les résultats DRX et MEB vont à l'encontre de cette idée. En effet sur les diffractogrammes présentés, le COD est bien cristallisé et c'est grâce à l'ajout de citrates que l'on obtient des morphologies bien définies (bipyramides par observation au MEB). Nous supposons qu'une certaine quantité de citrates sont piégées à l'intérieur des canaux zéolithiques, ce qui conduit à un élargissement de la raie de résonance $^{13}$C et à une diminution importante du paramètre $T_{1\rho}(^{1}H)$.

### *iii. Action des ions citrates (post-synthèses) sur les cristaux*

Précédemment, nous avons mis au point des protocoles permettant de moduler la taille des cristaux de COM (sur au moins un ordre de grandeur). Pour évaluer l'influence potentielle des ions citrates sur la phase COM, nous avons utilisé les cristaux suivants :

- COM synthétisé par voie classique (goutte à goutte) et vieillis pendant deux semaines sans agitation (voir Chapitre 1). La taille moyenne de ces cristaux est ~ 20 µm.
- COM synthétisé en tube en U, en présence du gel de gélatine A, pendant 1 mois. Comme décrit ci-dessus, la taille moyenne des cristaux obtenus est alors beaucoup plus grande : de l'ordre de 200 à 300 µm.

Dans la suite de ce paragraphe, nous allons étudier l'influence de différentes combinaisons {solvant/ion} sur les faces cristallines. Comme point de départ, nous avons décidé de caractériser les cristaux mis en jeu par MEB, *avant* toute immersion dans les différentes solutions.

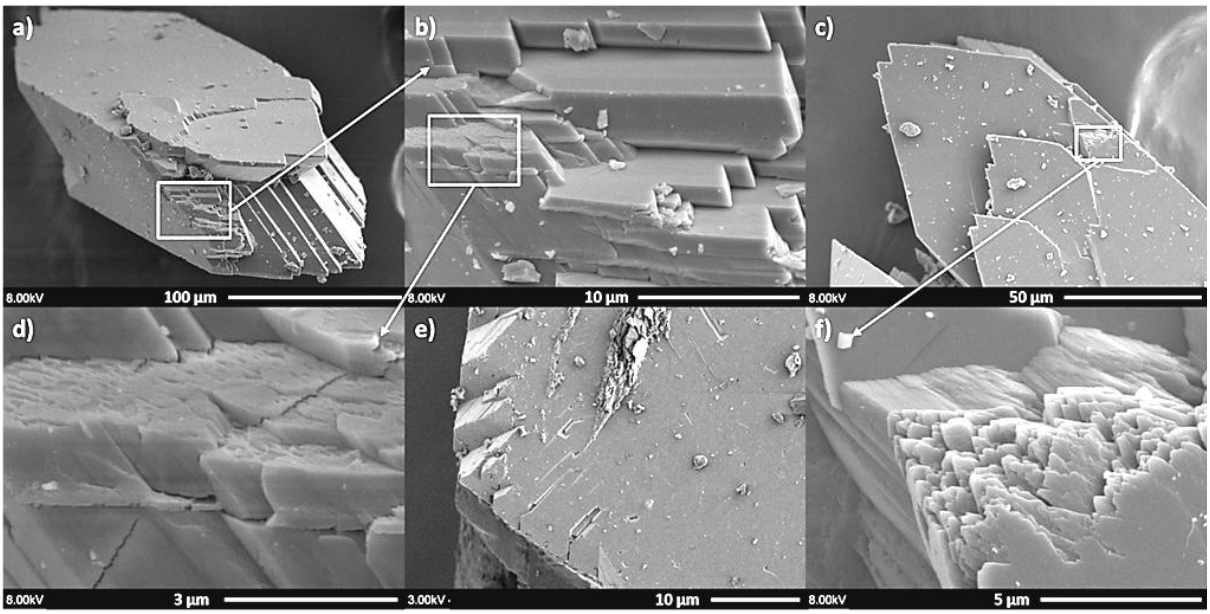



**Figure 5-14 : Images MEB de cristaux de COM obtenus par synthèse en gélatine de type A, Ca/Ox = 1/1 (tube en U – voir paragraphe 1.a)).**

La Figure 5-14 présente une succession d'agrandissements relatifs à un cristal de COM de très grande taille (voir Figure 5-14a). La forme globale en "pince à linge" est bien mise en évidence (voir paragraphe 1.a).iii ci-dessus). La zone de fracture d'une des faces du gros cristal (Figure 5-14b) montre un assemblage complexe d'empilement de states cristallines (Figure 5-14d). La même observation est faite sur les Figure 5-14c et Figure 5-14f. Enfin, nous observons certains dépôts (ou éventuellement croissances latérales) sur la Figure 5-14e.

Nous allons décrire l'action de différentes solutions sur la morphologie des cristaux de COM : eau osmosée et éthanol (qui sont utilisés lors des phases de lavage des cristaux de COM, et solution aqueuse d'ions citrates. Les expériences faites en présence d'eau osmosée et d'éthanol permettent de bien caractériser l'action spécifique des ions citrates.

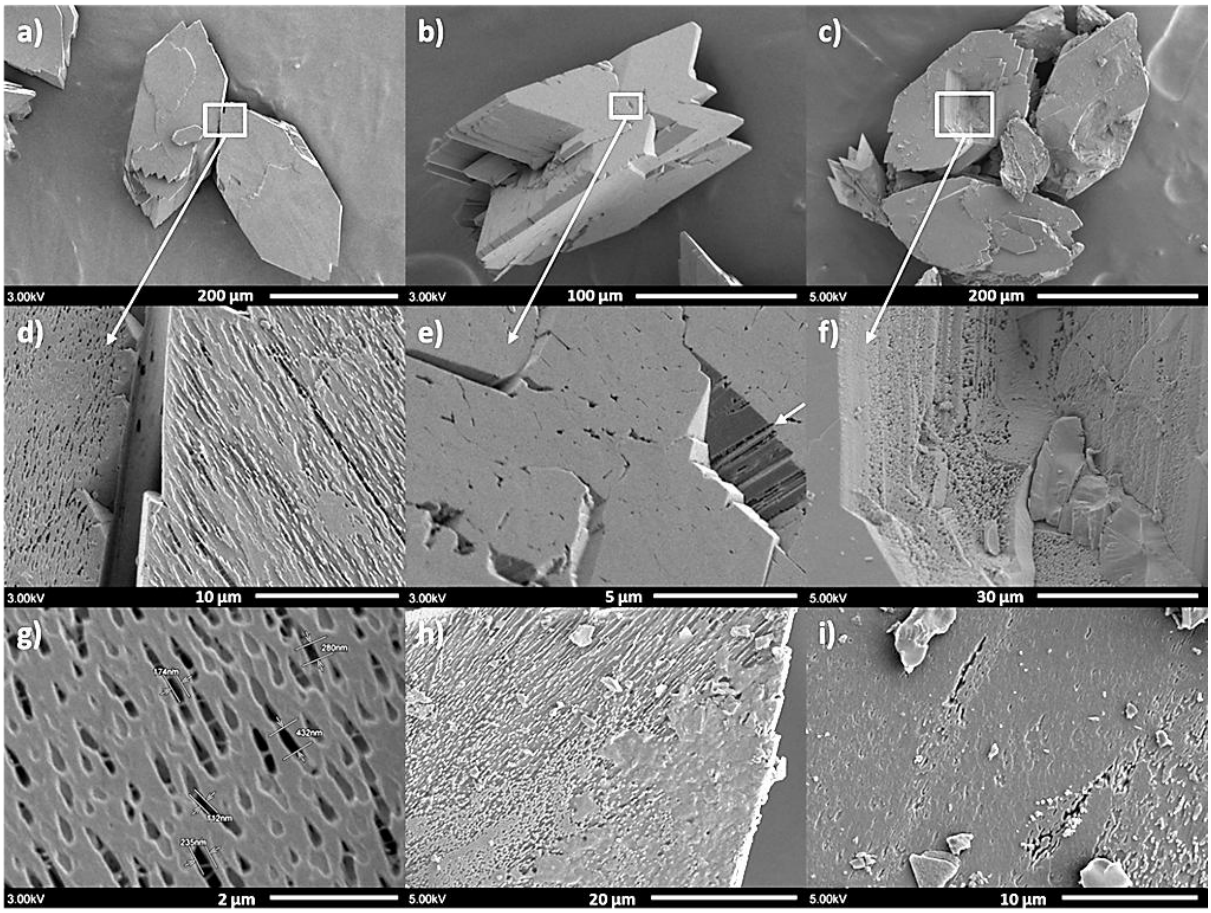



**Figure 5-15 : Images MEB de cristaux de COM obtenus par synthèse dans la gélatine de type A (tube en U – voir paragraphe 1.a)) et immergés dans de l'eau osmosée pendant 24 heures.**

La Figure 5-15 présente la morphologie des cristaux de COM (formés dans la gélatine de type A) après immersion pendant 24 heures dans l'eau osmosée. Les cristaux en forme globale de "pince à linge" sont bien mis en évidence sur les Figure 5-15a et Figure 5-15b. En comparant ces images à celles présentées sur la Figure 5-14 (analyse par MEB immédiatement après synthèse), il est très intéressant de noter que les surfaces ne restent pas intactes en présence d'eau. En plus des surfaces, le cœur du cristal semble également être modifié comme le démontre la Figure 5-15c (et l'agrandissement présenté sur la Figure 5-15f). Une porosité particulière est mise en évidence. A ce stade, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : ***(i)*** la faible solubilité de COM dans l'eau ($K_s = 2{,}32.10^{-9}$ à 25°C) peut être évoquée pour expliquer une légère modification des faces cristallines, ***(ii)*** rappelons que les cristaux étudiés ont été synthétisés en gel de gélatine : il est possible qu'une certaine quantité de gélatine ait été intégrée au sein des cristaux lors des processus de cristallisation. Ce phénomène a été décrit dans plusieurs travaux récents par Nindiyasari *et coll.* [15], ainsi que par Chen *et coll.* [16]. Dans cette dernière publication, les auteurs mettent en évidence l'incorporation de la matrice gel dans certains cristaux synthétisés (AgCl, AgI et CuCl) dans ce milieu par dissolution du cristal dans un solvant adéquat. Les cristaux formés dans un gel d'agarose semblent incorporer la matrice de croissance à l'inverse de ceux synthétisés dans un gel de silice. Ils proposent dès lors deux mécanismes de formation distincts : ***(i)*** formation d'un monocristal qui « pousse » le réseau de gel pour croître et ***(ii)*** formation d'un cristal qui incorpore le réseau de gel au sein même de sa structure. De nombreux biomatériaux incorporent dans leur structure une partie de la matrice de croissance. On peut citer par exemple, les nacres, qui présentent une structure de

type « sandwich » [17] impliquant des protéines et une phase inorganique majoritaire (aragonite). La gélatine étant également soluble dans l'eau, elle pourrait ainsi se dégrader à l'échelle de 24 heures et laisser une empreinte négative sur certaines faces cristallines ainsi qu'au cœur des cristaux de COM. On peut noter que ces marques n'apparaissent que sur certaines faces cristallines, (100), les autres faces restant globalement intactes (Figure 5-15e et Figure 5-15i). La Figure 5-15f (voir flèche blanche) et la Figure 5-15g vont dans ce sens en mettant en évidence des filaments au sein de cavités créées durant l'immersion de l'échantillon dans l'eau. Il est tentant de relier chimiquement ces filaments à de la gélatine.

L'expérience suivante est identique au niveau du mode opératoire : cette fois, les cristaux de grande taille de COM sont immergés dans de l'éthanol durant 24 heures. Rappelons que l'éthanol est utilisé lors du processus de lavage des cristaux.

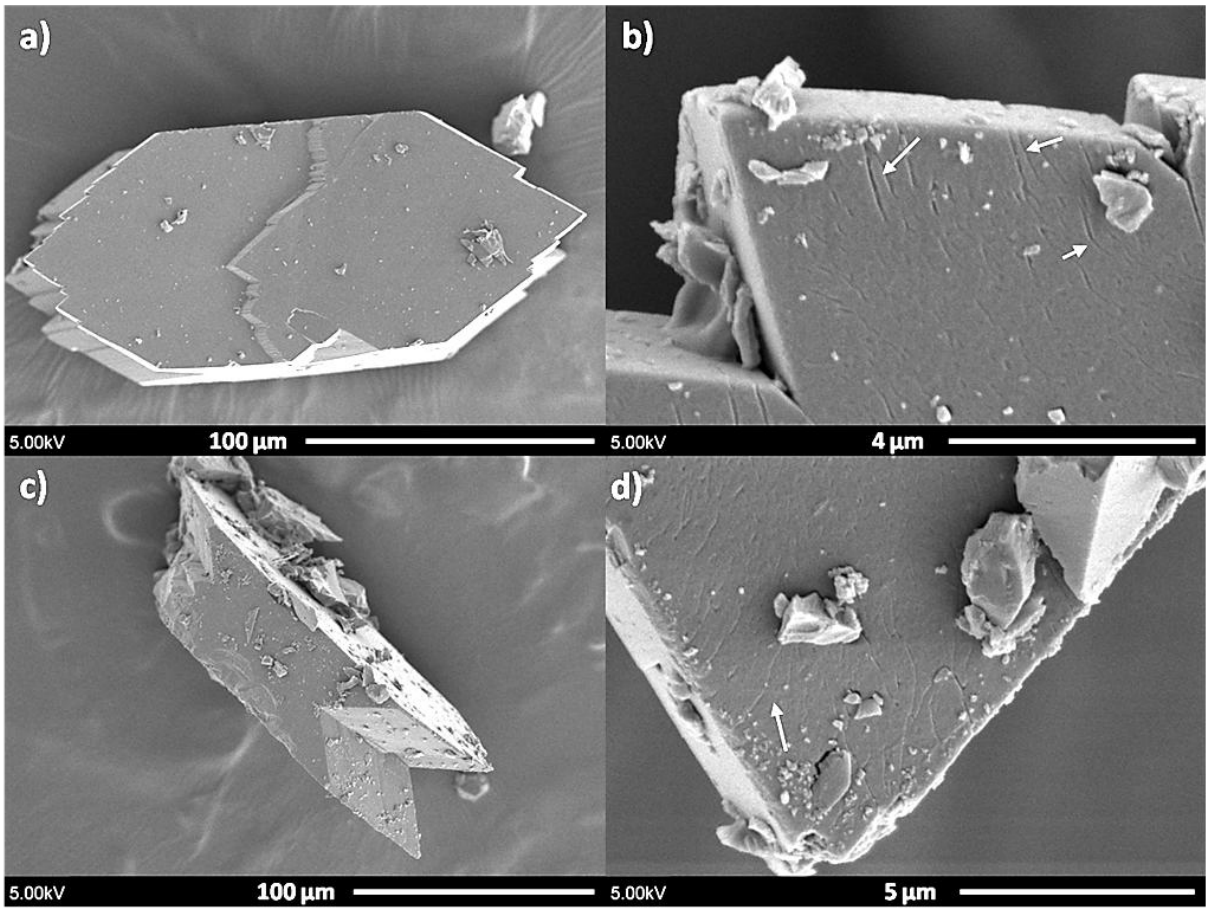



**Figure 5-16 : Images MEB de cristaux de COM obtenus par synthèse dans la gélatine de type A (tube en U – voir paragraphe 1.a)) et immergés dans de l'éthanol pendant 24 heures.**

La Figure 5-16 présente des cristaux dont les faces sont relativement nettes. Les surfaces n'ont été que peu endommagées dans l'éthanol, contrairement aux résultats obtenus après immersion dans l'eau. On remarque néanmoins quelques légères "stries" sur les bords des surfaces. La gélatine n'est pas soluble dans l'éthanol.

En conclusion, il apparaît donc que l'effet de l'eau osmosée sur les cristaux de COM obtenus en milieu gélatine ne peut pas être négligé. De profondes modifications des surfaces cristallines (voire du cœur des cristaux) ont été nettement mises en évidence. Il est dès lors possible d'analyser l'effet

potentiel des ions citrates en solution aqueuse sur les mêmes échantillons. La solution utilisée est une solution de concentration en ions citrates égale à 0,100 mol.L$^{-1}$ (eau osmosée). L'immersion des cristaux est une fois encore de 24 heures.

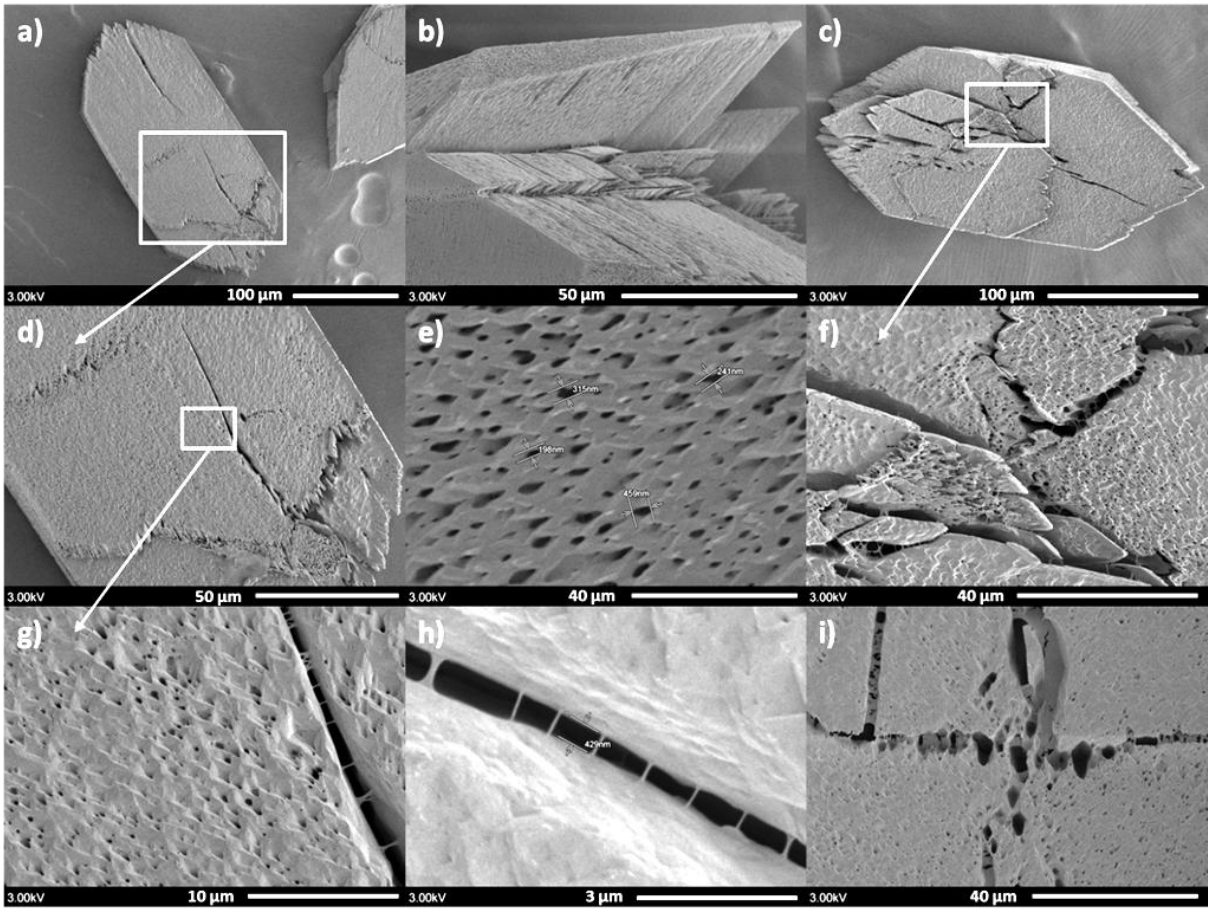



**Figure 5-17 : Images MEB de cristaux de COM obtenus par synthèse en gélatine de type A (tube en U voir paragraphe 1 ; a).) et immergés dans une solution aqueuse (eau osmosée) de citrates (0,100 mol.L$^{-1}$) pendant 24 heures.**

Sur la Figure 5-17, on peut préciser l'effet des ions citrates sur les cristaux de COM (initialement en forme de "pince à linge") tout en gardant en mémoire les effets du solvant aqueux (mis en évidence sur la Figure 5-15). La première observation est relative à la présence de "macro"-fissures au niveau des gros cristaux de COM (Figure 5-17a Figure 5-17d). De telles fissures larges n'avaient pas été observées jusqu'à présent. On remarque également une érosion nette des bords de cristaux (Figure 5-17a). A plus fort grossissement, l'intérieur des fissures est caractérisé par la présence de nombreux filaments (Figure 5-17h). Ces filaments agissent comme des ponts reliant les deux bords d'une fissure donnée. Une fois encore les filaments peuvent être attribués à l'insertion de la matrice de croissance (gélatine de type A) au sein des cristaux de grande taille de COM. Les Figure 5-17e, Figure 5-17f et Figure 5-17g montrent clairement un autre type d'altération au niveau des surfaces cristallines en présence d'ions citrates.

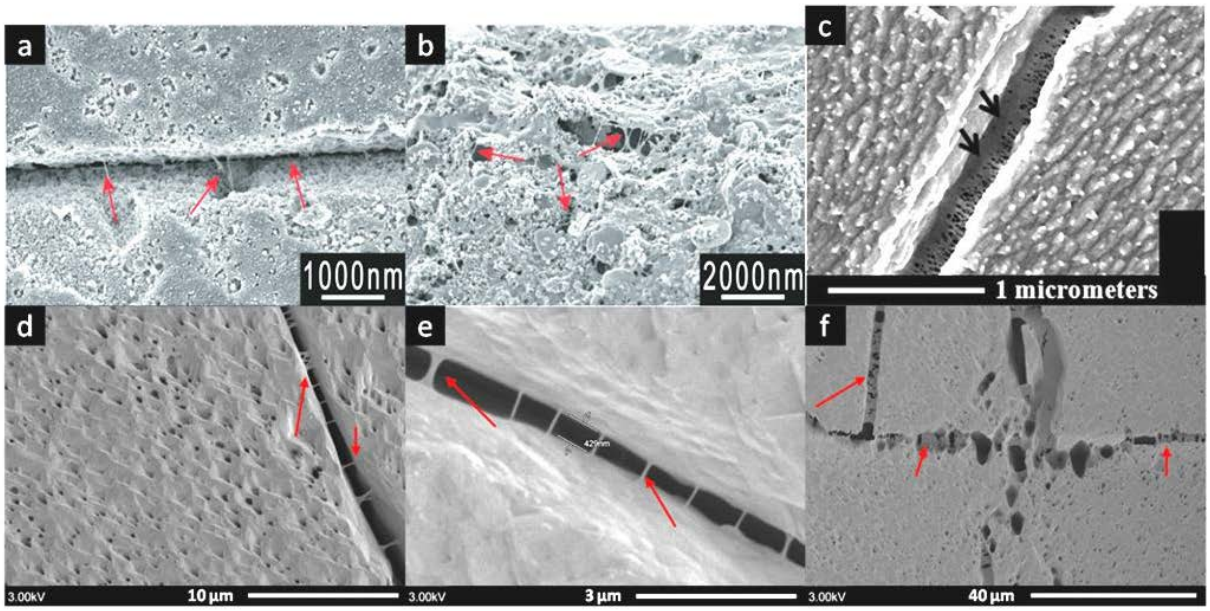



**Figure 5-18 : Comparaison d'images MEB de la littérature avec nos expériences. a) cristal d'AgCl synthétisé dans un gel d'agarose (0,2 % en masse) et b) cristal de CuCl synthétisé dans un gel d'agarose (1,0 % en masse) d'après** [16] **, c) cristal de calcite synthétisé dans la gélatine (2,5 % en masse) d'après** [15]**. d), e) et f) cristaux de COM obtenus par synthèse en gélatine de type A et immergés dans une solution aqueuse (eau osmosée) de citrates (0,100 mol.L$^{-1}$) pendant 24 heures.**

La comparaison de nos expériences avec certaines images de la littérature (Figure 5-18) permet d'affirmer que ces filaments nanométriques reliant les fissures de nos cristaux sont probablement formés de la matrice de gel (ici gélatine de type A). Les Figure 5-18a, b, d et e ont des profils similaires de par la présence de simples fils de la matrice. Les Figure 5-18c et f montrent elles, un réseau plus structuré de gélatine reliant les deux bords des fissures.

En comparaison des expériences faites dans l'eau osmosée (Figure 5-15), l'impact des ions citrates en solution aqueuse peut être résumé ainsi : ***(i)*** formation de larges fissures qui entaillent les cristaux de COM, ***(ii)*** mise en évidence (comme dans le cas de l'eau osmosée) de nombreux filaments pouvant être attribués à de la gélatine provenant du milieu de synthèse. Ces filaments ne sont pas visibles après immersion dans l'éthanol (Figure 5-16), ***(iii)*** altération plus nette des surfaces cristallines en présence d'ions citrates. Ces derniers ont évidemment tendance à chélater les ions calcium de surface conduisant à une "érosion" progressive des surfaces en contact avec le solvant.

Il apparaît ainsi que le milieu de synthèse des cristaux de COM n'est pas neutre lors de la croissance cristalline lente à l'interface des solutions initiales d'ions calcium et oxalates (au sein du tube en U). Ainsi, il semble acquis que la gélatine de type A puisse jouer un rôle particulier au cours de la synthèse et interagisse fortement dans la cohésion des cristallites (*via* des "ponts" de type filamenteux).

De façon à décorréler l'influence de la gélatine de l'action du solvant et des ions citrates à proprement parler, les expériences d'immersion de cristaux (durant 24 heures) ont été renouvelées à partir de cristaux formés par goutte à goutte (voir Chapitre 1 partie 1 c)). Des cristaux de relativement grande taille (sans atteindre néanmoins celles obtenues par croissance en gel) ont été synthétisés par vieillissement des solutions mères. La Figure 5-19 présente les résultats obtenus.

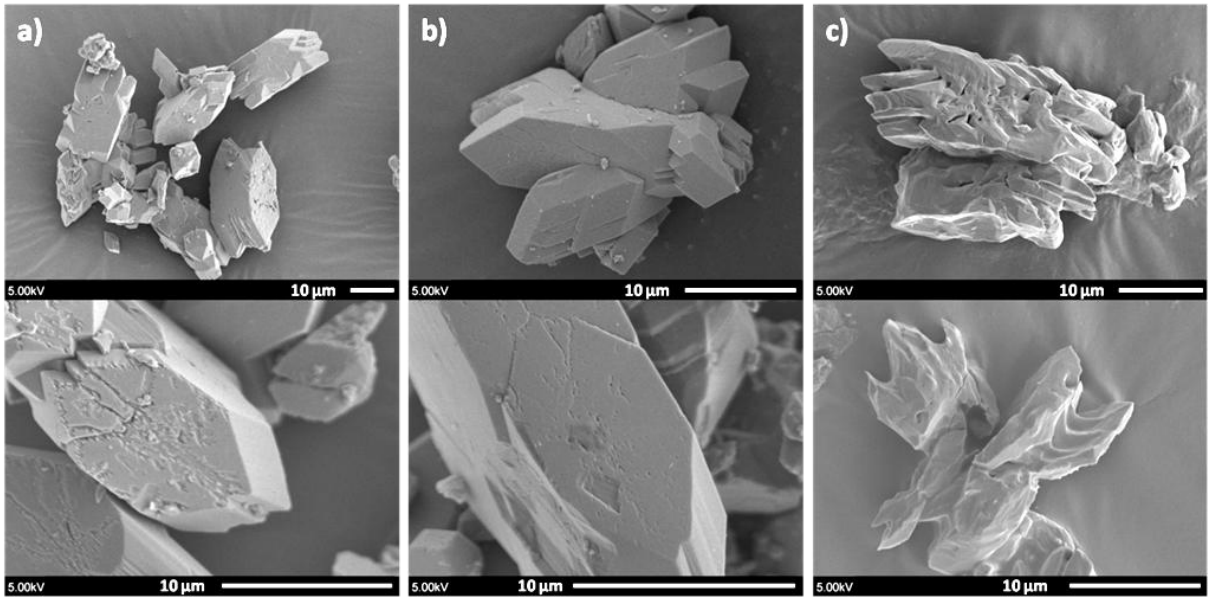



**Figure 5-19 : Images MEB de cristaux de COM obtenus par synthèse en goutte à goutte (voir Chapitre 1) et immergés dans différentes solutions. a) eau osmosée. b) éthanol. c) solution aqueuse (eau osmosée) de citrates (0,100 mol.L$^{-1}$). Dans les trois cas, la durée d'immersion est fixée à 24 heures.**

Tout d'abord, et comme attendu, nous observons des tailles de cristaux beaucoup plus faibles que dans le cas des synthèses effectuées en gel. Il en résulte que les objets étudiés dans les Figure 5-15, Figure 5-16 , Figure 5-17 et Figure 5-19 ne sont pas strictement identiques. Néanmoins, certaines tendances peuvent être proposées : ***(i)*** le solvant éthanol (Figure 5-19b) n'a pas d'influence notable sur la morphologie et l'aspect global des faces cristallines. Une telle observation avait déjà été faite au préalable (Figure 5-16), ***(ii)*** une fois encore, le rôle de l'eau solvant n'est pas totalement négligeable (Figure 5-19a, à comparer à la Figure 5-15). Une certaine "érosion" des surfaces est bien en évidence. En revanche, les cavités et filaments caractéristiques de la Figure 5-15 ne sont plus du tout présents. Cette observation corrobore notre hypothèse concernant le rôle majeur joué par la gélatine au cours de la cristallisation du COM, ***(iii)*** enfin, le rôle de chélatant des ions citrates est bien démontré sur la Figure 5-19c. La morphologie des cristaux de COM est totalement modifiée, démontrant une attaque chimique des surfaces cristallines par les ions citrates. Nous avions noté auparavant une telle action des ions citrates (Figure 5-17) avec en particulier l'apparition de fissures de grande taille au sein des gros cristaux de COM. Dans le cas de la Figure 5-19, il est probable que, compte tenu de la plus petite taille des cristaux de départ, l'attaque chimique des ions citrates soit particulièrement efficace et conduise en 24 heures à une modification drastique des objets cristallins.

### c) Interactions du thé vert avec les oxalates de calcium

En dehors de l'eau, le thé est la boisson la plus bue au monde. Il existe de nombreux thés différents : thé vert, thé noir, … Dans cette section, nous allons tenter d'appréhender l'action de l'extrait de thé vert sur des échantillons synthétiques d'oxalate de calcium. Au niveau clinique, et en particulier à l'hôpital Tenon, un lien a été établi entre la consommation de thé vert et l'apparition de certaines calcifications pathologiques. Le rôle des composants du thé vert est encore sujet à de nombreuses discussions : ceux-ci sont parfois considérés comme des inhibiteurs de cristallisation de par leur action de réduction du stress oxydant [18], [19] ou par chélation et dégradation de l'oxalate de

calcium [3], mais également comme des composants susceptibles d'accélérer la formation des calcifications en présence d'ions oxalates [20], [21].

A l 'image de ce que nous avons entrepris précédemment dans le cas des ions citrates, nous allons étudier ici l'effet de l'extrait de thé vert sur des cristaux de grande taille de COM. Il est évident que cette étude ne peut que refléter partiellement l'action réelle du thé dans le rein, puisque qu'avant d'atteindre cet organe, ce dernier passe par de multiples transformations et filtrations. Néanmoins, les molécules constitutives du thé vert peuvent être présentes dans les urines [22] et donc influencer la formation des calculs rénaux. S'agissant d'un composé naturel, nous avons décidé d'utiliser la même source de thé tout au long de nos travaux. Le thé vert choisi de marque Sen-cha a été acheté en grande quantité chez un commerçant parisien du XIII$^{ème}$ arrondissement.

### i. *Composition chimique du thé : bibliographie et analyses par RMN $^{1}$H MAS et $^{13}$C CP MAS*

Le thé est composé de nombreuses molécules organiques. Nous le buvons en infusions, c'est-à-dire que nous extrayons de la plante (par l'eau chaude) les molécules aromatiques ainsi que les principes actifs. Récemment, Reto *et coll*. [23] ont étudié la composition chimique d'infusions de thé vert. Les catéchines (molécules présentant des fonctions polyols) semblent être présentes en forte proportion (voir la Figure 5-20). On peut également noter la présence de caféine et de différents cations tels que sodium, potassium, aluminium... De façon très intéressante, Charrier *et coll*. [20] montrent également la présence d'ions *oxalates* dans différentes infusions. Pour les thés verts, on peut avoir de 0,25 mg d'oxalates par gramme de thé à 1,15 suivant la marque de thé utilisé.

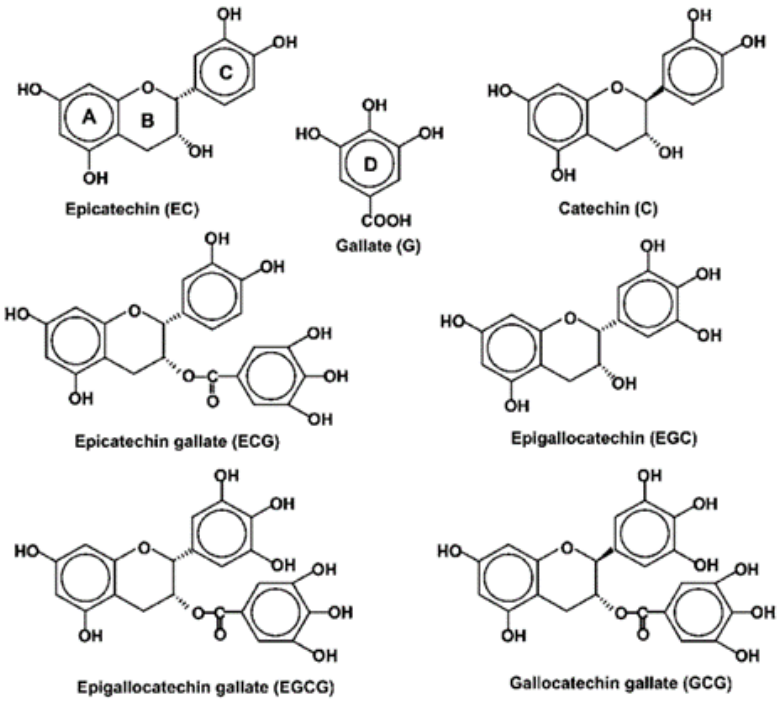



**Figure 5-20 : Structures des composants principaux du thé vert : les catéchines, d'après** [3].

Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de ces catéchines sur la formation des différentes phases d'oxalate de calcium hydraté. Dans une publication parue en 2010, Chen *et coll.* [3] ont proposé un travail similaire mettant en œuvre une synthèse par diffusion d'ammoniac. En s'inspirant de leurs

travaux mais en les adaptant à nos propres protocoles de synthèse (principalement précipitation par goutte à goutte – voir Chapitre 1), nous avons tenté d'évaluer l'impact de telles molécules sur la morphologie des cristaux formés, mais également sur les signatures obtenues par RMN en phase solide. Pour cela, nous nous appuierons sur les données RMN en phase solide déjà enregistrées et relatives aux cristaux de COM, COD et COT présentées dans le Chapitre 3.

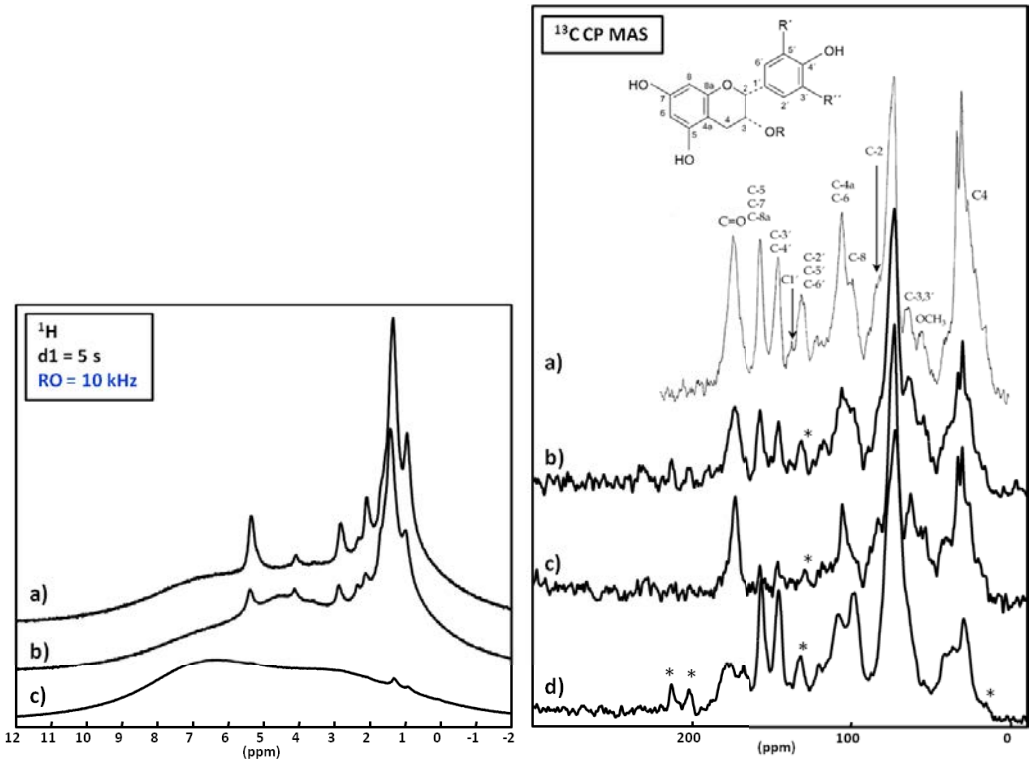



**Figure 5-21 : A gauche : Spectres RMN $^{1}$H MAS : a) des feuilles de thé vert. b) des feuilles de thé vert séchées après infusion dans de l'eau à 100°C (5 minutes). c) de l'extrait sec de l'infusion. RO : fréquence de rotation MAS. d1 : délai de relaxation $^{1}$H. A droite : Spectres RMN $^{13}$C CP MAS : a) des feuilles de thé vert, d'après [24], $\tau_{CP}$ (temps de contact) = 1,5 ms ; d1 (délai de relaxation) = 4 s et RO (fréquence de rotation) = 4,25 kHz. b) des feuilles du thé vert Sencha, c) des feuilles de thé vert séchées après infusion. d) de l'extrait sec de l'infusion. b), c) et d) ont été enregistrés avec les paramètres suivants : $\tau_{CP}$ = 2 ms d1 = 2 s et RO = 10 kHz. Les * correspondent à des bandes de rotations.**

Les spectres RMN $^{1}$H MAS et $^{13}$C CP MAS des feuilles de thé (avant et après infusion), ainsi que de l'extrait sec obtenu après infusion, sont présentés sur la Figure 5-21. Les spectres $^{1}$H MAS n'ont pas été publiés à ce jour. Dans le cas des feuilles de thé avant et après infusion (spectres a) et b) à gauche de la Figure 5-21), une résolution tout à fait acceptable est observée, et ce, malgré une fréquence de rotation MAS modérée (ici 10 kHz). Cette résolution peut être attribuée à une mobilité locale élevée des différentes molécules, ce qui conduit à une moyenne partielle de l'interaction homonucléaire $^{1}$H-$^{1}$H. Les déplacements chimiques isotropes $^{1}$H sont caractéristiques de groupements aliphatiques et insaturés (au-delà de 5 ppm) que l'on retrouve dans les constituants essentiels des feuilles de thé : policosanol (mélange d'alcools aliphatiques), caféine, acide tannique, terpène, *etc.* [25], [26], [27]. Le spectre $^{1}$H MAS de l'extrait sec (spectres c) à gauche de la Figure 5-21) présente une allure complètement différente, comparable à celle de spectres $^{1}$H peu résolus obtenus pour des espèces rigides. Les spectres $^{13}$C CP MAS des différentes préparations sont présentés à droite de la Figure 5-21. Dans ce cas, il existe des données dans la littérature relatives à différentes variétés de thé (voir Martínez-Richa *et coll.* [24] – Figure 5-21a). Des attributions sont proposées en prenant en

compte la famille des catéchines : il y a bien évidement dans tous ces signaux, d'autres composants du thé (autres polyphénols, caféine…). Le spectre $^{13}C$ CP MAS de notre variété de thé vert (Figure 5-21b) est tout à fait comparable à celui publié dans la littérature. Le spectre de l'extrait sec est également comparable bien que des variations relatives d'intensités soient observées. On notera que les contributions relatives à l'éventuelle présence d'ions oxalates sont sans doute partiellement masquées par les résonances des groupements C=O**.** L'utilisation d'un temps de contact plus long n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'ions oxalates, preuve de sa faible concentration.

### *ii. Synthèses en présence de thé vert*

L'extrait de thé a été préparé de la façon suivante : 1,000 g de thé a été ajouté dans 100 mL d'eau à ~ 100 °C pendant 5 minutes. Après infusion, l'ensemble a été filtré sur papier filtre. La solution ainsi obtenue a été directement utilisée pour les différentes synthèses mises en œuvre. L'évaporation complète de la solution conduit à 0,300 g d'extrait sec.

Plusieurs synthèses ont été envisagées (se reporter au Chapitre 1 pour plus de détails). Elles concernent à la fois la synthèse des cristaux d'oxalates de calcium en présence d'infusion de thé et l'évolution de cristaux synthétisés au préalable, lorsque ceux-ci sont immergés dans une solution d'extrait de thé (voir paragraphe 1.b).i ci-dessus dans le cas des ions citrates) :

- La synthèse par goutte à goutte : des changements dans les conditions de synthèse (température, agitation, vieillissement, ajout de la solution de thé) ont été apportés spécifiquement. Des volumes ($V_{thé}$) de 1 à 50 mL d'infusion de thé ont été ajoutés à une solution de $CaCl_2$ (cette dernière étant complétée avec de l'eau pour atteindre $[Ca^{2+}]$ = 0,010 mol.$L^{-1}$. Chaque solution est ensuite laissée pendant deux heures sous agitation, et à température ambiante. Une solution aqueuse d'oxalate de sodium ($[C_2O_4^{2-}]$ = 0,010 mol.$L^{-1}$) est ajoutée goutte à goutte dans la solution ($CaCl_2$ + thé). L'ajout des ions oxalates a été effectué : avec ou sans agitation, et à température ambiante ou à 40 °C. Certaines solutions ont été laissées à évoluer durant 6 jours (avec ou sans agitation), de façon à étudier le vieillissement des cristaux formés.

- La synthèse par diffusion de vapeurs d'ammoniac, comme décrite dans la contribution de Chen *et coll.* [3] : 90 mL d'infusion de thé et 5 mL d'une solution de $CaCl_2$ (0,100 mol.$L^{-1}$) ont été mélangés, puis le pH a été abaissé à 2 par ajout de HCl. Une autre solution (sans thé) composée de 90 mL d'$H_2O$ et 5 mL de $CaCl_2$ a également été préparée (elle correspond à la manipulation de contrôle). Ces solutions ont été maintenues à 4°C pendant 6 heures. 5mL d'une solution de $Na_2C_2O_4$ (0,100 mol.$L^{-1}$) ont été ajoutés dans chacune des solutions mélanges. Les deux béchers ont été alors placés dans un dessiccateur fermé, en présence d'un troisième bécher contenant une solution d'ammoniac (28-30 %) recouvert d'un film percé (parafilm). La diffusion lente des vapeurs d'ammoniac a lieu à température ambiante durant six jours. Les cristaux ont ensuite été récupérés par filtration sous vide et lavés à l'eau et à l'éthanol.

- La synthèse en gel (paragraphe 1.a)) en remplaçant l'eau des solutions de précurseurs par l'infusion de thé (1 g de thé dans 100 mL d'eau) : soit les deux solutions de précurseurs ont été préparées à partir de l'infusion de thé, soit seulement une des deux. Les concentrations

et volumes des expériences précédentes sont conservés ($[Ca^{2+}] = [C_2O_4^{2-}] = 0{,}100$ mol.L$^{-1}$) et V = 10 mL). Quelques expériences en incorporant le thé aux gels (gélatine et agar-agar) ont également été réalisées.

- L'influence du thé sur des cristaux déjà formés (COM). Des cristaux d'environ 20 µm ont été directement immergés dans une infusion de thé.

Les cristaux sont collectés par filtration sous vide à l'aide d'un fritté à pores P5 et lavés plusieurs fois à l'eau et à l'éthanol. Après séchage, les cristaux sont récupérés pour analyses par MEB et RMN $^{13}$C CP MAS.

#### *iii. Résultats expérimentaux*

Dans un premier temps, nous nous intéressons à la synthèse par goutte à goutte (voir paragraphe ii. ci-dessus). Les observations expérimentales les plus importantes sont les suivantes :

- lorsque $V_{thé}$ augmente de 1 à 50 mL, la phase COD devient majoritaire. Pour les valeurs les plus élevées de $V_{thé}$, elle est alors quasiment la seule présente.
- en présence d'agitation magnétique, il est possible d'obtenir la phase COT. Néanmoins, pour $V_{thé}$ > 20 mL, la phase COT n'est plus observée, au profit des phases COM et COD.
- pour $V_{thé}$ < 10 mL, le vieillissement des solutions n'induit pas l'obtention d'une phase unique de COD.
- de même, le vieillissement des solutions ne permet pas d'obtenir des cristaux de COD de plus grande taille (comme cela était le cas en milieu gel – voir paragraphe 1.a).iii.)
- l'élévation de la température de synthèse (à 40°C) ne modifie pas les résultats expérimentaux : la phase COD est toujours obtenue majoritairement.

De ces faits expérimentaux, nous pouvons en déduire que les catéchines du thé (et autres molécules de l'infusion) autorisent un changement de phase, de COM à COD, et ce, même à 40°C (sans ajout de thé et dans les mêmes conditions, seul la phase de COM est obtenue – voir Chapitre 1). On remarque néanmoins que la formation des oxalates de calcium hydratés n'est pas inhibée dans les conditions expérimentales choisies : en effet, la même masse de précipité est obtenue par précipitation en présence et en absence d'infusion de thé.

Les cristaux obtenus en fonction de la variable $V_{thé}$ ont alors été analysés par MEB. Les expériences ont été réalisées ici à température ambiante (Figure 5-22).

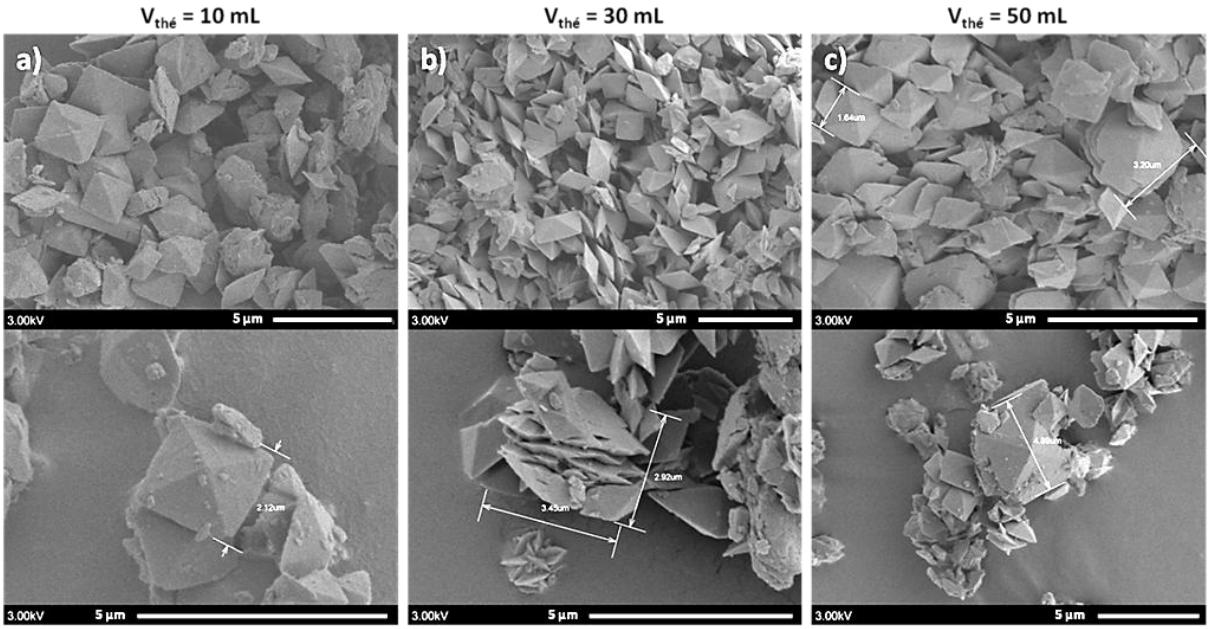



**Figure 5-22 : Images MEB des synthèses par goutte à goutte avec ajout de thé ($V_{thé}$ variable) à température ambiante. a) $V_{thé}$ = 10 mL. b) $V_{thé}$ = 30 mL. c) $V_{thé}$ = 50mL. La définition de $V_{thé}$ est donnée dans le paragraphe 1.c).ii.**

La morphologie des cristaux observés correspond à une bipyramide, caractéristique de la phase COD. L'augmentation progressive de $V_{thé}$ conduit à la formation majoritaire de phase COD. Pour $V_{thé}$ = 10 mL, des agrégats pouvant correspondre à du COT sont également présents en faible proportion. Ces derniers disparaissent avec l'augmentation de la quantité de thé. Des synthèses identiques à 40°C conduisent globalement aux mêmes résultats.

La synthèse par diffusion de vapeurs d'ammoniac, inspirée du travail de Chen *et coll.* [3], a donné des résultats différents de ceux de cette publication mais en accord avec les expériences précédentes.

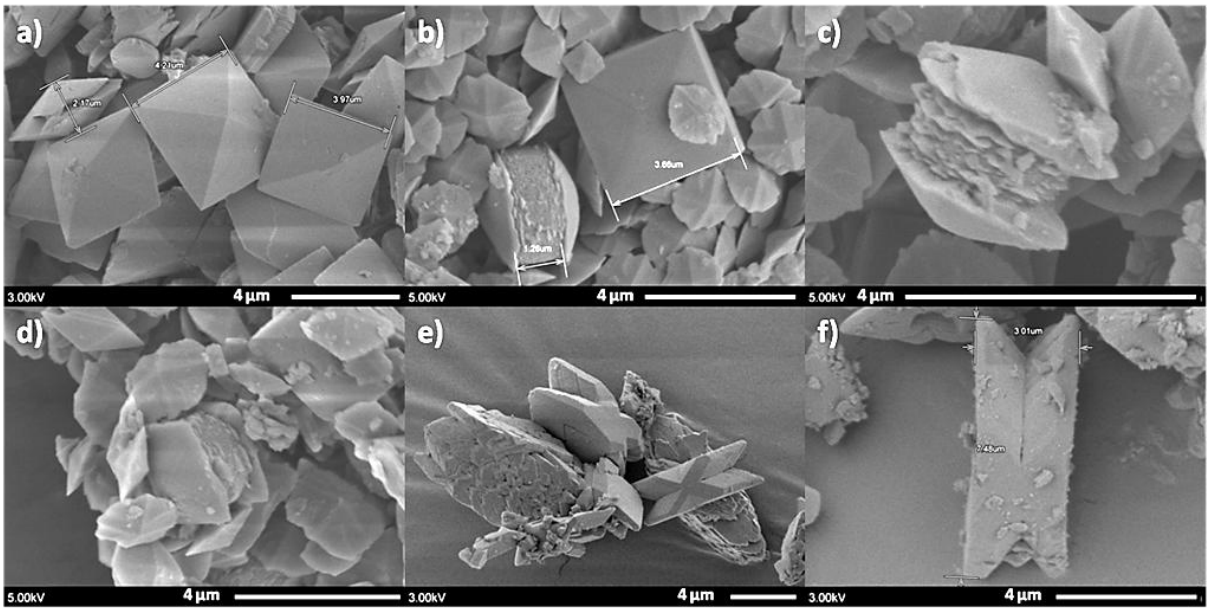



**Figure 5-23 : Images MEB des synthèses par diffusion d'ammoniac. a), b), c), d) avec 90mL de thé. e) et f) sans ajout de thé. Voir paragraphe 1.c).ii.**

Comme on peut le voir sur les Figure 5-23a, 23b, 23c et 23d la présence de thé et *a fortiori* de chélatants du calcium amène à la formation de la phase COD exclusivement. Elle est reconnaissable par cette morphologie caractéristique bipyramidale. Néanmoins on peut voir certaines petites bipyramides avec des imperfections ce qui les rend plus similaires à des étoiles. La Figure 5-23c montre quant à elle un type de morphologie observé par Chen *et coll.* [3]. L'élongation du COD n'a été observée que lors de cette synthèse et est due à la formation d'un mésocristal orienté. En comparaison, les Figure 5-23e et 23f montrent la morphologie classique du COM obtenu (ici sans ajout de thé) par la synthèse en diffusion d'ammoniac. On peut noter que certains cristaux présentent des surfaces altérées, sûrement du fait des conditions de synthèse (pH très élevé).

Afin de tenter d'obtenir des bipyramides de plus grande taille, nous avons essayé de combiner l'utilisation de l'extrait de thé (qui semble orienter préférentiellement la cristallisation de la phase COD) et la synthèse en milieu gel (tube en U) (voir paragraphe 1.a)). Deux options de synthèse ont été retenues : la première consiste à synthétiser un gel contenant préalablement l'extrait de thé. La deuxième implique l'ajout de l'extrait de thé à l'une des solutions de précurseurs, en partie haute du tube en U.

■ La première expérience décrite ici correspond à la synthèse classique dans un gel d'agar-agar (en proportion stœchiométrique : $[Ca^{2+}] = [C_2O_4^{2-}] = 0{,}100$ mol.L$^{-1}$). L'infusion de thé a été ajoutée directement au moment de la synthèse du gel à la place de l'eau osmosée, $V_{thé} = 30$ mL.

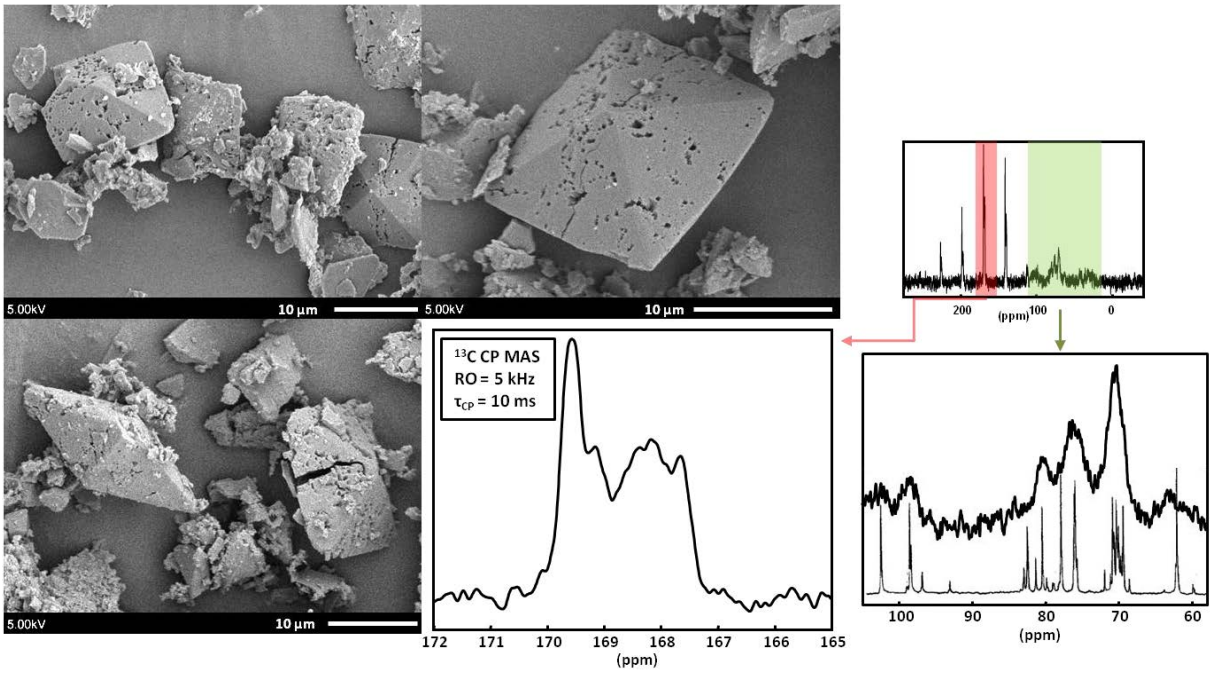



**Figure 5-24 : Images MEB des cristaux issus de la synthèse en gel d'agar-agar (le gel contenant l'extrait de thé vert initialement) et spectre RMN $^{13}$C CP MAS. La présence d'agar-agar est mise en évidence en vert sur le spectre le spectre du bas correspond à l'agarose d'après [10]. $\tau_{CP}$ : temps de contact (ms); RO : fréquence de rotation MAS (kHz).**

Sur la Figure 5-24 sont présentées des images MEB relatives à la synthèse en gel contenant l'extrait de thé. Clairement, une majorité de cristaux de COD en bipyramide est mise en évidence. Comme attendu, la taille moyenne des cristaux (~ 10 µm) est plus grande que dans le cas de la synthèse en goutte à goutte (voir ci-dessus). Contrairement aux expériences précédentes, les cristaux de COD présentent une texture tout à fait particulière au niveau des faces cristallines. Celles-ci présentent en

effet des "cavités" de ~ 300 à 500 nm. De tels défauts de surface ont déjà été observés par certains auteurs. On peut citer les travaux de Rode *et coll.* [4] qui après avoir plongé un calcul rénal (COD) dans une infusion de thé ont mis en évidence l'apparition de cavités carrées. Les travaux de Chen *et coll.* [3] montrent également une influence du thé sur la morphologie du COD obtenu. Suivant la quantité de thé ajoutée lors de leurs synthèses, les mésocristaux formés sont de plus en plus gros, cela grâce à l'intercalation de la phase minérale avec les macromolécules du thé. Le thé a par ailleurs été proposé très récemment dans un brevet afin d'aider au traitement des calculs rénaux grâce à sa capacité propre à les dégrader [28]. La Figure 5-24 présente également le spectre RMN $^{13}$C CP MAS des cristaux obtenus. La présence de COD (~ 169,5 ppm) est bien mise en évidence, alors qu'une phase de COM est également détectée (cf déplacements chimiques plus faibles). Le spectre est difficilement quantifiable car les conditions optimales d'enregistrement des spectres $^{13}$C CP MAS du COM et du COD varient selon la phase considérée (voir Figure 5-13). Le nombre de bandes de rotation est élevé du fait de la faible valeur de la fréquence de rotation MAS. Une telle valeur permet en effet de limiter les effets de modifications de phases *in situ* (voir Chapitre 3). On notera enfin la présence de résonances (faibles) relatives à la présence de résidus d'agar-agar. Nous avons en effet montré précédemment que le nettoyage des cristaux lors de leur collecte était particulièrement délicat en présence d'agar-agar.

■ La seconde expérience reprend un protocole de synthèse en gel (ici gélatine de type A) mais dans ce cas particulier, la solution d'ions calcium ([$Ca^{2+}$] = 0,100 mol.$L^{-1}$) est préparée à partir d'une infusion de thé. Le gel de gélatine A ne contient pas d'extrait de thé.

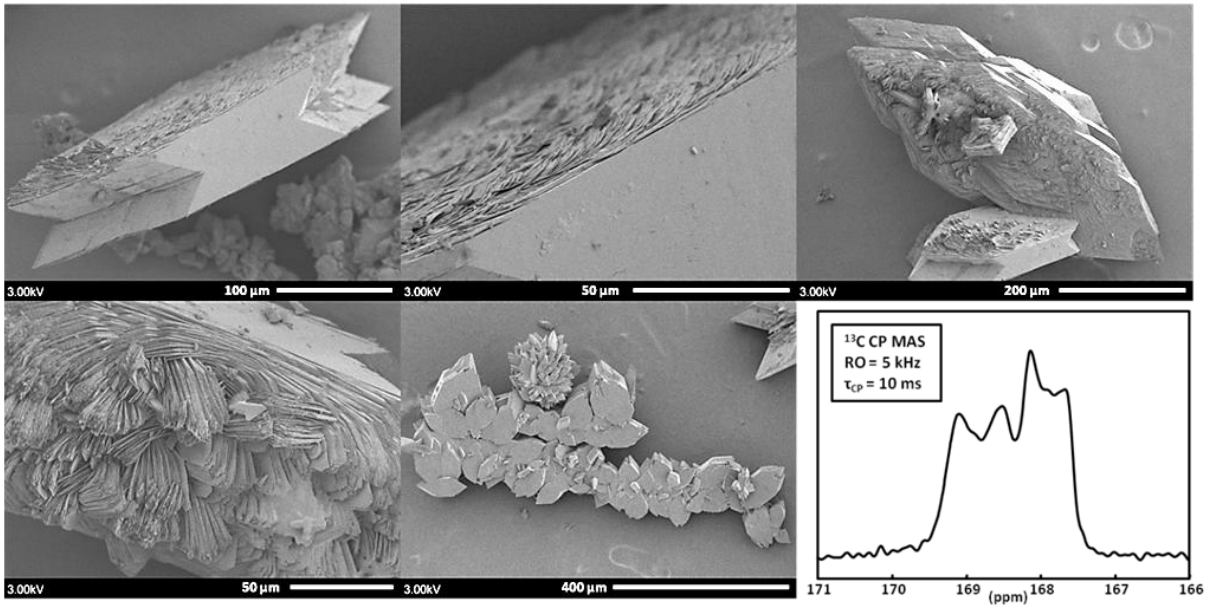



**Figure 5-25 : Images MEB des cristaux issus de la synthèse en gel de gélatine A. Le gel ne contient pas d'extrait de thé. En revanche, le précurseur d'ions calcium contient l'extrait de thé. Spectre RMN $^{13}$C CP MAS. $\tau_{CP}$ : temps de contact (ms); RO : fréquence de rotation MAS (kHz).**

Contrairement à l'expérience précédente, on obtient ici presque exclusivement des cristaux de COM de très grande taille (voir les images MEB de la Figure 5-25). La morphologie des surfaces est tout à fait surprenante : on observe en effet pour la toute première fois des croissances en forme de feuilletage. Le spectre RMN $^{13}$C CP MAS présenté sur la Figure 5-25 est cohérent avec l'observation de cristaux de COM. Ce phénomène particulier de croissance a également été observé lorsque

l'extrait de thé a été ajouté à la solution contenant les ions oxalates, en partie haute du tube en U. Dans ce cas particulier, des cristaux de très grande taille (100 à 400 µm) ont été clairement mis en évidence.

Grohe *et coll.* [29] ont effectué des expériences montrant que les faces (100) et (121) adsorbent de façon préférentielle les molécules hydrophiles. L'adsorption n'est d'ailleurs pas forcément synonyme d'inhibition de croissance. Sur la Figure 5-25, on observe clairement un monocristal de COM présentant une face (100) recouverte de feuillets très fins. La croissance épitaxiale peut être favorisée par l'incorporation de macromolécules qui viennent compenser les défauts du réseau cristallin. Dans notre cas, l'homo-épitaxie est favorisée par la présence de molécules chélatantes du thé. Ces dernières se plaçant préférentiellement sur la face (100), augmentent la probabilité de croissance épitaxiale sur cette même face.

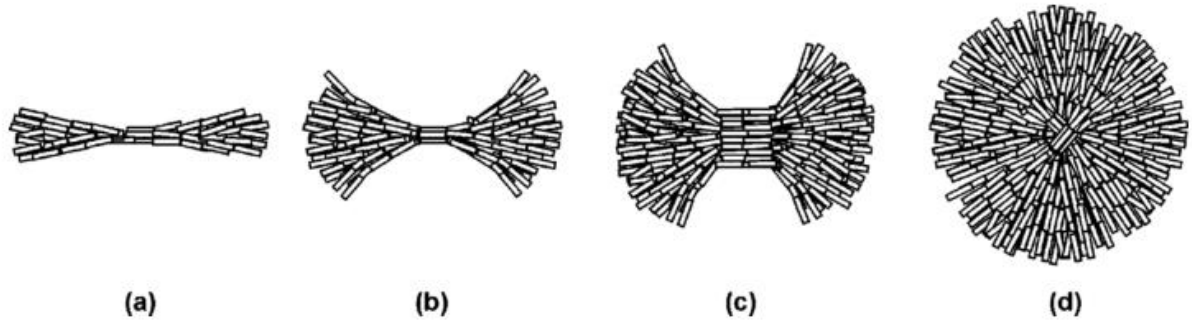



**Figure 5-26 : Schéma de formation d'agrégat de calcite de** [15]**. De a) à d) évolution et croissance de l'agrégat jusqu'à la formation d'une sphérulite.**

On retrouve assez souvent des morphologies en sphérulite comme proposé sur la Figure 5-26 lors de nos expériences. Plus la densité de gel augmente, plus il est probable d'en créer, ce qui semble cohérent avec les morphologies obtenues (Figure 5-5). D'après Uhlmann *et coll.* [30], un autre critère doit être pris en compte : la vitesse de croissance. Plus la croissance est rapide, plus l'incorporation de la gélatine est grande.

Pour finir, lorsque des cristaux (COM) de taille moyenne (~ 20 µm) sont plongés pendant plusieurs jours dans une infusion de thé, on observe une dégradation indéniable de leur morphologie.

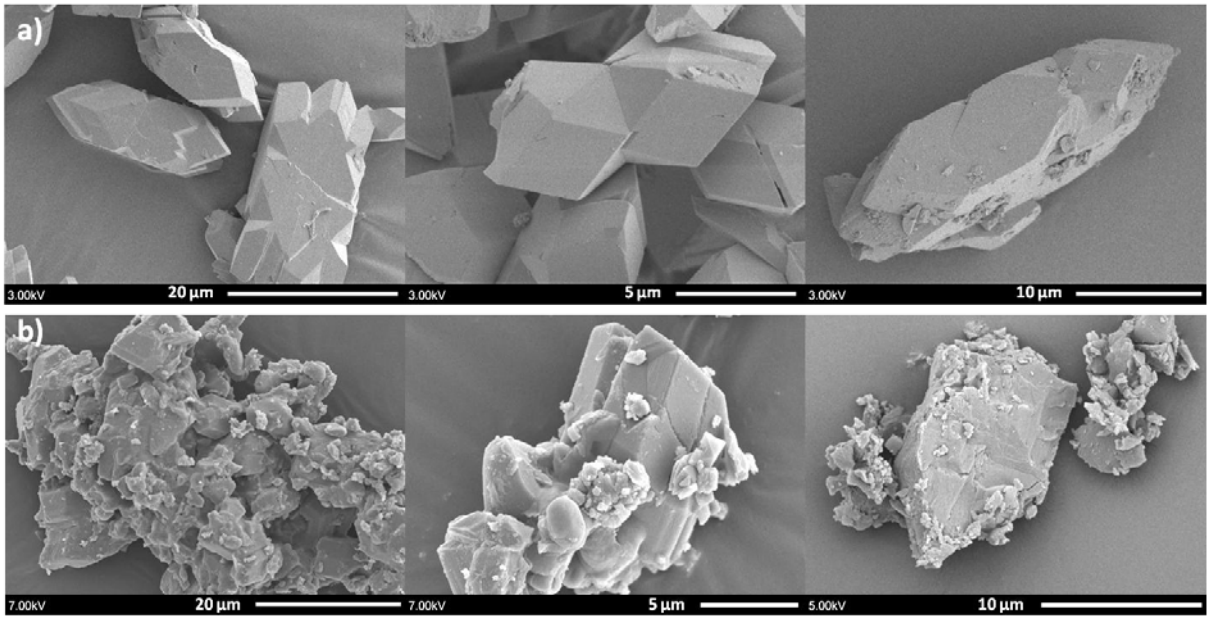



**Figure 5-27 : Images MEB de a) cristaux de COM synthétisés par goutte à goutte en proportions stœchiométriques Ca/Ox = 1/1 à T°ambiante et laissés à vieillir 12 jours dans le milieu réactionnel (sans agitation). b) ces mêmes cristaux immergés dans 10 mL d'infusion de thé pendant 6 jrs.**

La différence entre les clichés de la Figure 5-27a et ceux de la Figure 5-27b tend à montrer l'effet de destruction des molécules du thé (catéchines) envers la phase de COM. Cela a déjà pu être observé sur des calculs de whewellite [28]. En parallèle, l'immersion pendant 12 jours de ces monocristaux de COM dans l'eau osmosée prouve que l'effet est bien dû au thé puisqu'aucune altération n'a été mise en évidence (autre que celle montrée sur la Figure 5-19a).

## 2. Croissance d'oxalates de calcium en surface d'hydroxyapatite

Comme énoncé précédemment (voir Introduction et Chapitres 1 et 3), il est admis dans la littérature que la plaque de Randall joue un rôle prépondérant dans la nucléation des calculs d'oxalate de calcium [31]. Statistiquement parlant, de plus en plus de calculs rénaux sont caractérisés par la présence de cette plaque de nature apatitique [32]. D'un point de vue morphologique, l'observation détaillée de la plaque de Randall conduit à des résultats tout à fait particuliers.

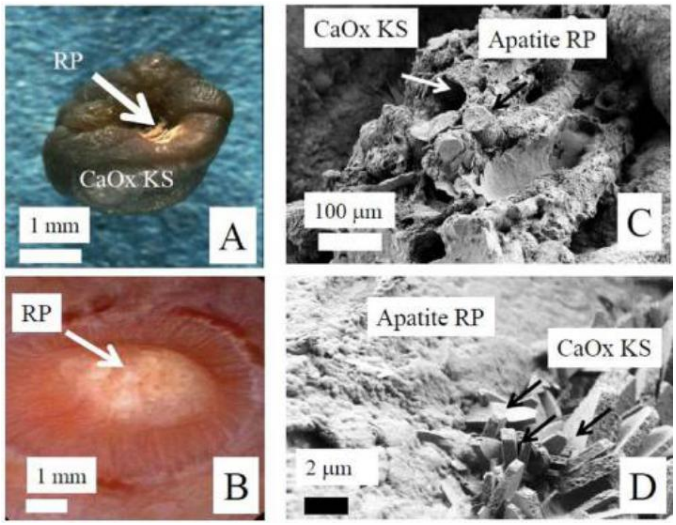



**Figure 5-28 : A) Plaque de Randall sur un calcul rénal de COM. B) Plaque de Randall à la surface de la papille. C) La plaque de Randall apparait comme une structure complexe contenant des tubules calcifiés. D) interface entre une plaque de Randall et un calcul de COM d'après** [33].

En effet, la phase désordonnée d'apatite (sans doute carbonatée) se présente sous la forme particulière de sphéroïdes de taille micrométrique (voir Figure 5-28). Cet ordre de grandeur de taille n'a donc rien à voir avec les dimensions nanométriques des plaquettes d'apatites constitutives des os et des dents. Les cristaux de COM apparaissent comme littéralement "incrustés" dans les sphères de la plaque de Randall. Notons également que la morphologie des cristaux de COM (plaquettes d'une épaisseur de quelques microns) est ici tout à fait particulière par rapport aux morphologies classiques rencontrées durant ce travail (par exemple la forme de « pince à linge » rencontrée à plusieurs reprises).

Le but de cette section est de tendre vers une synthèse *in vitro* d'assemblages micrométriques d'oxalate de calcium (essentiellement sous forme de COM, compte tenu de sa prévalence au niveau clinique) et d'hydroxyapatite (que nous choisirons non-carbonatée dans un premier temps, de façon à ne pas compliquer outre mesure la synthèse). Bien entendu, il apparaît hors de propos de mettre en œuvre une simple synthèse d'apatite par précipitation en voie aqueuse. Nous avons vu dans le Chapitre 1 qu'un tel protocole expérimental conduisait systématiquement à des nanoparticules, jusqu'à une température de traitement thermique de l'ordre de 400°C. Nous avons donc orienté notre axe de recherche vers des synthèses à plus haute température. Nous avons également utilisé les acquis expérimentaux présentés dans ce Chapitre (synthèses faisant intervenir des ions citrates, de l'extrait de thé vert …) de façon à élargir les possibilités expérimentales.

### a) Synthèse de sphères micrométriques d'hydroxyapatite

Dans un premier temps, des nanoparticules d'hydroxyapatite ont été synthétisées (par synthèse en autoclave, voir Chapitre 1). Les caractéristiques de celles-ci sont présentées dans le Chapitre 3 (étude par DNP CPMAS). Afin d'obtenir une surface la plus définie possible, et en vue de faire croître des cristaux de COM, nous avons opté pour une étape de pastillage, avant d'envisager un traitement thermique à haute température. Le pastillage a été effectué à l'aide d'une presse utilisée en IR (8 T/cm² pendant 5 minutes). Après pastillage de l'apatite et un recuit à 1050°C pendant trois heures, les échantillons ainsi obtenus ont été caractérisés par MEB (Figure 5-29). On remarque tout d'abord un assemblage compact (relativement plan) de particules d'hydroxyapatite dont la taille moyenne

peut être estimée à 300 nm environ. Cet ordre de grandeur est comparable à celui observé au niveau des plaques de Randall (voir Figure 5-28D ci-dessus). Quelques défauts au niveau de l'assemblage sont mis en évidence également. La surface de la pastille apparaît comme étant frittée grâce au traitement thermique. Cependant, pour certaines expériences, les pastilles d'apatites ont été cassées en plusieurs morceaux faisant apparaitre une partie plus poreuse en leur intérieur (car non frittée).

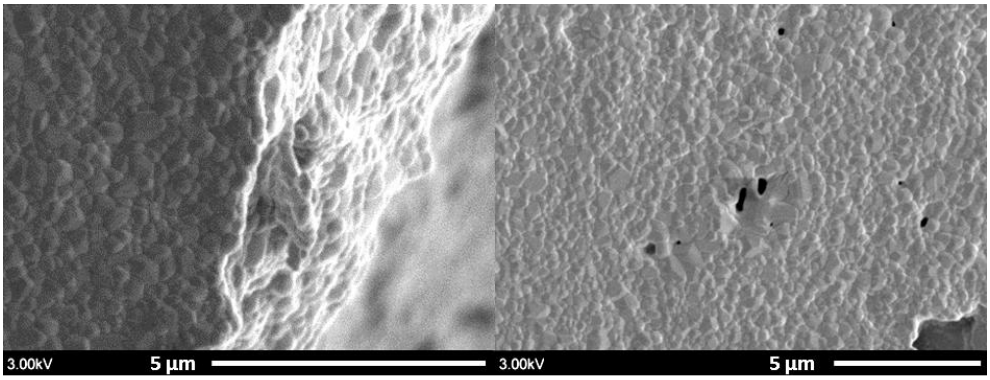



**Figure 5-29 : Images MEB d'une surface d'HAp (hydroxyapatite) obtenue après pastillage et traitement thermique à 1050°C pendant 3 heures. La surface de la pastille présente un frittage plus important.**

Les fragments ainsi obtenus ont été plongés dans différentes solutions aqueuses pendant trois durées différentes (24 heures, 4 jours et 3 semaines). Il a ainsi été possible d'exposer au solvant la surface de la pastille (la plus frittée) ainsi que des zones situées dans l'épaisseur de la pastille (plus poreuses *a priori*). Notons qu'une telle expérience a déjà été proposée par Sethmann *et coll.* [34] dans la littérature prouvant qu'un tel mécanisme est probable pour la formation de calcul rénal à partir d'une plaque d'apatite. A partir d'apatite commerciale (os bovin), les auteurs ont testé différentes conditions de synthèse (pH, milieu de synthèse) de COM sur cette plaque. De notre côté, nous partons de nanoparticules synthétiques « optimisées » pour être relativement proche de celles de la plaque de Randall d'un point de vue morphologique. De plus, différents milieux à base de chélatants du calcium et de différents pH ont été testés.

Après réaction, les pastilles d'HAp ont été retirées du milieu réactionnel, lavées à l'eau distillée et à l'éthanol puis observées par MEB. Trois milieux de synthèse ont été choisis :

- une solution aqueuse d'oxalate de sodium à 0,010 mol.L$^{-1}$ à pH ajusté à 3,7 avec HCl.
- une solution aqueuse d'oxalate de sodium à 0,010 mol.L$^{-1}$ et de citrates à 0,001 mol.L$^{-1}$.
- une solution aqueuse d'oxalate de sodium à 0,010 mol.L$^{-1}$ contenant 1,0 g de thé vert.

***Nous remarquons qu'aucune de ces solutions ne contient d'ions calcium***. Une synthèse de contrôle a été effectuée dans chacun des cas : durant 3 semaines, une pastille d'HAp a été immergée dans la solution de synthèse, mais sans apport d'ions oxalates. L'intérêt majeur de ces manipulation est de prouver que la croissance hétérogène d'oxalate de calcium (phase COM essentiellement) est tout à fait possible sur une surface constituée d'un assemblage de sphères d'HAp, et ce, sans apport extérieur d'ions calcium. En d'autres termes, les ions calcium d'une phase de type COM ne peuvent provenir que d'une dissolution partielle de l'hydroxyapatite. Un suivi du pH a été systématiquement effectué. En effet, ce dernier joue un rôle important sur la libération des ions calcium (la dissolution de l'HAp). A des pH acides, l'apatite se dissout plus facilement [35], [36]. Lors des expériences dans

l'eau, le pH a varié de 3,7 à 4,7. Pour celles effectuées en présence de citrates, le pH a varié de 6,3 à 7,4; alors que pour les expériences en présence d'extraits de thé, celui-ci a évolué de 6,0 à 5,1.

### b) Résultats

#### *i. Les expériences de contrôle*

Afin de vérifier les effets des solvants sur les pastilles d'hydroxyapatite traitées thermiquement, une portion de celles-ci est immergée dans chacun des milieux d'études : ***(i)*** eau osmosée acidifiée à pH = 3,7 avec HCl, ***(ii)*** une solution aqueuse de citrate (0,001 mol.$L^{-1}$) et ***(iii)*** infusion de thé (1 g de thé dans 100mL d'eau). Dans chaque cas, la durée de l'expérience a été de 3 semaines, en absence totale d'ions oxalates. Après ce laps de temps, les pastilles sont retirées de la solution, rincées à l'eau et séchées à l'air libre.

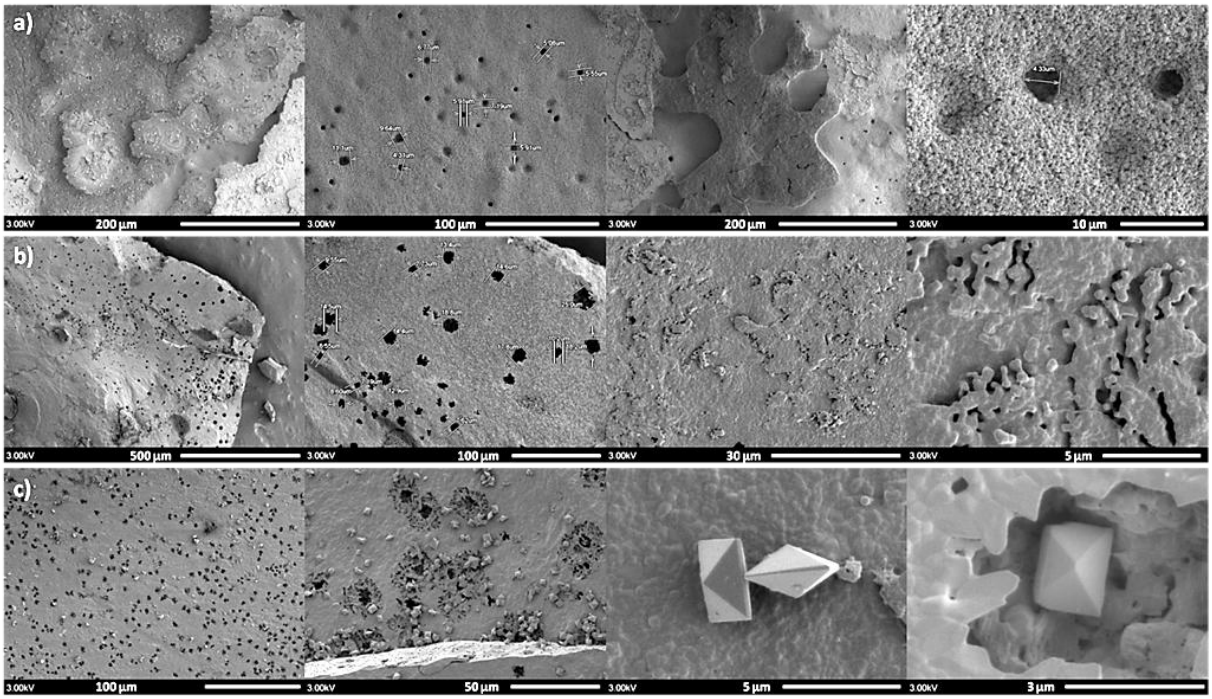



**Figure 5-30 : Images MEB des pastilles d'HAp : expériences de contrôle. a) HAp dans l'eau (pH = 3,7). b) HAp dans la solution aqueuse contenant des ions citrates. c) HAp dans une solution aqueuse contenant l'extrait de thé vert.**

En observant les clichés de MEB sur la Figure 5-30, il semble qu'aucun des milieux choisis ne soit totalement inerte vis-à-vis des pastilles d'HAp. Comme attendu, l'eau à pH = 3,7 dissout légèrement la pastille. Ainsi, sur la Figure 5-30a, on observe des "craquelures" au niveau de la surface ainsi que quelques perforations (de 4 à 10 µm). Ces perforations rendent sans doute compte de la dissolution partielle évoquée ci-dessus. En en ce qui concerne l'influence des ions citrates, l'effet est encore plus net (Figure 5-30b) : en effet la pastille est percée de multiples trous, de différents diamètres (de 10 à 25 µm). Les images de la Figure 5-30c montrent les effets de l'extrait de thé vert sur la plaque d'HAp : une fois encore, il y a apparition de trous (de 3 à 5 µm) aux bords irréguliers. De manière particulièrement intéressante, on observe surtout la croissance de cristaux de COD (de 1 à 5 µm), à *la morphologie bipyramidale parfaitement reconnaissable* ! Les cristaux de COD semblent « insérés » dans la couche d'apatite. Des "empreintes" de cristaux sur la surface sont également mises en évidence. N'oublions pas que le thé vert contient une certaine quantité d'ions oxalates (voir

paragraphe 1.c).i.). La solubilisation partielle de l'hydroxyapatite en présence d'ions oxalates conduit ici à la cristallisation d'oxalates de calcium sous forme COD.

### *ii. Solution aqueuse d'ions oxalates*

Afin d'évaluer séparément l'effet des ions citrates et de l'extrait de thé (catéchines essentiellement), nous effectuons au préalable une expérience d'immersion d'une pastille d'HAp dans une solution aqueuse d'oxalate de sodium (0,010 mol.$L^{-1}$, pH = 3,7). Trois temps de vieillissement (24 heures, 4 jours et 3 semaines) sont testés successivement.

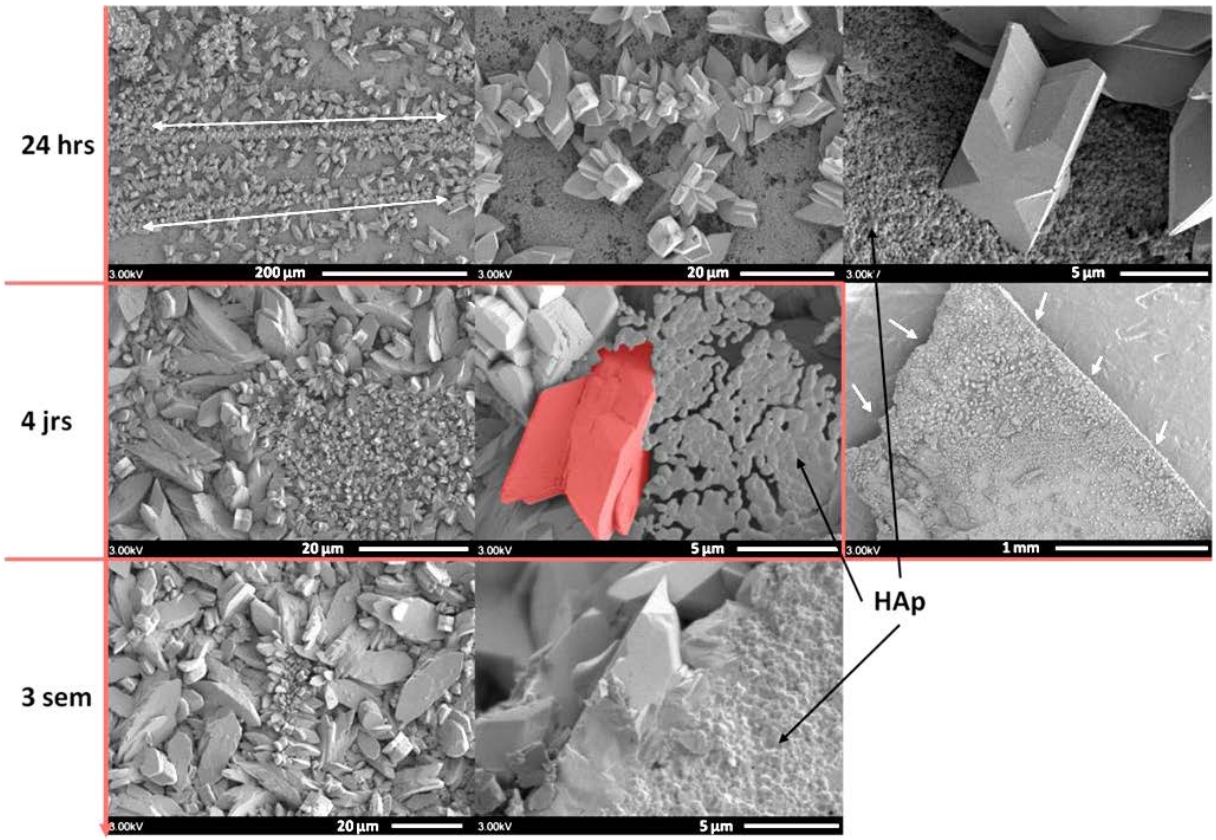



**Figure 5-31 : Images MEB des pastilles d'HAp immergées dans une solution aqueuse d'oxalate de sodium (0,010 mol.$L^{-1}$, pH = 3,7) pendant : 24 heures, 4 jours et 3 semaines. En rouge un cristal de COM. Les flèches blanches indiquent le bord de la pastille d'HAp.**

Les résultats de cette expérience sont présentés sur la Figure 5-31. Dès les premières 24 heures, la surface de la pastille se recouvre de cristaux de COM à la morphologie bien définie ("pince à linge"). Nous savons que l'HAp se dissout au moins partiellement en milieu acide, permettant ainsi la libération des ions calcium. La valeur du pH a été choisie arbitrairement (mais volontairement acide) afin de favoriser la croissance hétérogène du COM en surface de la pastille d'HAp. Durant les premiers jours d'expérience, la croissance du COM s'effectue majoritairement sur les bords de la pastille (flèches blanches sur la Figure 5-31). Quelques cristaux de plus petite taille se situent au centre de la pastille. On remarque également deux alignements presque parallèles de cristaux de petite taille (doubles flèches blanches sur la photo en haut à gauche après 24 heures). On peut supposer que ces deux lignes correspondaient à des fractures initialement présentes dans la pastille

d'HAp et que celles-ci ont été progressivement comblées au cours de la cristallisation du COM. Après une période de 4 jours d'expérience, la majeure partie de la pastille est recouverte de cristaux de COM. De plus, on remarque que les cristaux présentent une distribution en taille très importante (de 5 à 80 µm). Certaines parties de la plaque d'HAp se décollent manifestement et semblent se déliter (Figure 5-31, 4 jours, au centre). Après 3 semaines, toute la pastille est recouverte de cristaux de COM de grande taille. Les interstices restants sont comblés par des cristaux de taille plus réduite.

### *iii. Solution aqueuse d'ions oxalates et citrates*

Les expériences d'immersion des pastilles d'HAp ont été réitérées en présence d'ions citrates (0,001 mol.L$^{-1}$), le pH initial étant supérieur au $pKa_3$ de l'acide citrique (pH initial de synthèse = 6,6).

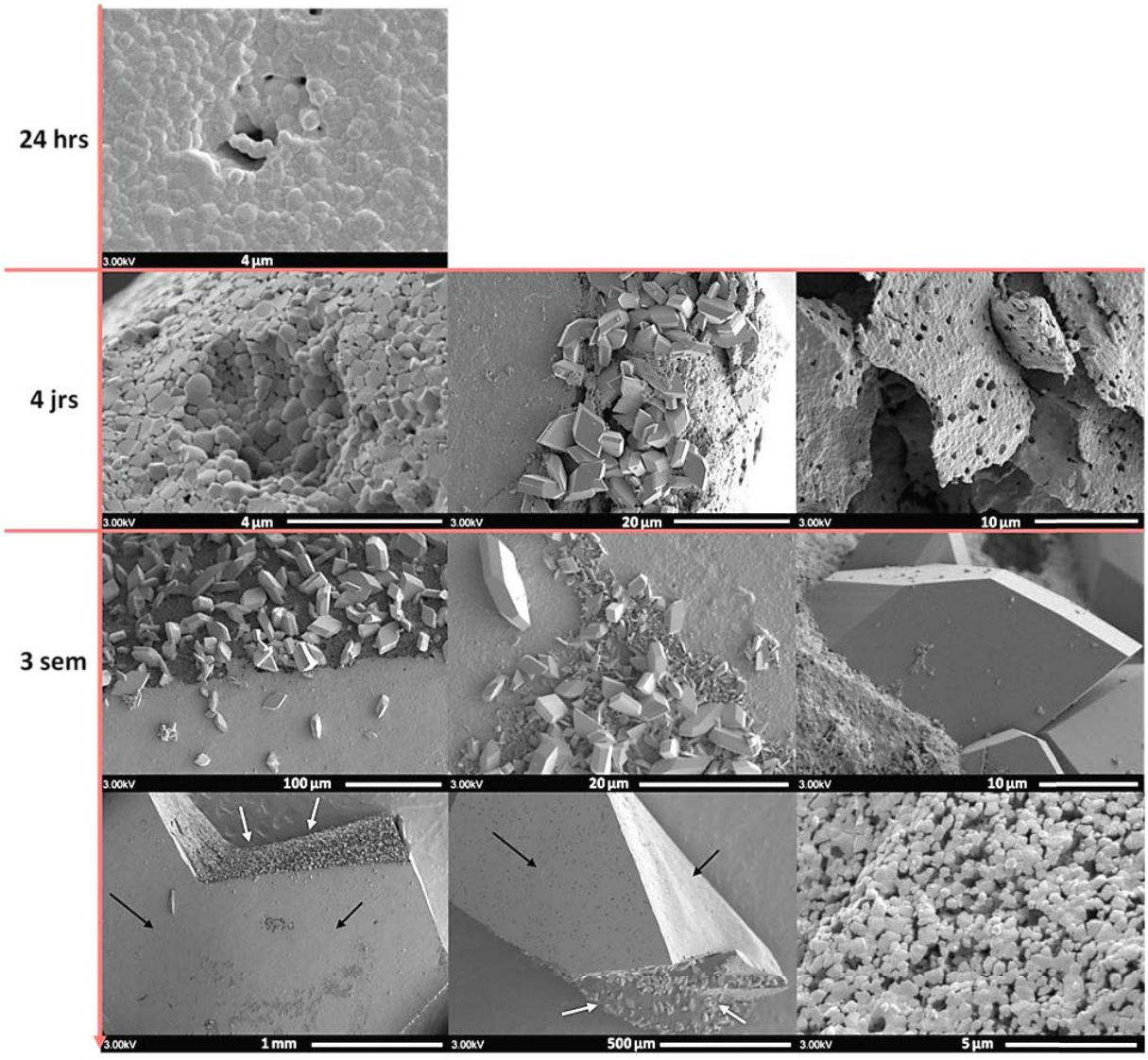



**Figure 5-32 : Images MEB des pastilles d'HAp immergées dans une solution aqueuse d'oxalate de sodium (0,010 mol.L$^{-1}$) et de citrates (0,001 mol.L$^{-1}$) pendant : 24 heures, 4 jours et 3 semaines. Les flèches noires montrent la surface frittée de la pastille. Les flèches banches montrent le cœur non frittée (le long de la cassure).**

Contrairement à l'expérience précédente (effectuée à dessein en pH acide), nous ne favorisons pas nécessairement la dissolution de la pastille d'HAp (à un pH initial de 6,6). La Figure 5-32 rend compte des résultats obtenus pour l'ajout des ions citrates. Après 24 heures, la pastille d'HAp semble

relativement intacte, mis à part quelques aspérités pouvant être présentes juste après le traitement thermique, avant immersion. Après 4 jours, la surface située au centre de la pastille d'HAp est toujours intacte. En observant plus précisément les bords de la pastille, il est cependant possible de mettre en évidence des cristaux de COM (~ 10 µm de taille moyenne). Une fois encore, quelques perforations sont également visibles (à l'image de ce qui a déjà été observé sur la Figure 5-30 dans le cas des expériences de contrôle). Après 3 semaines, des cristaux de COM sont nettement visibles, à la fois sur les bords (cristaux de grande taille, ~ 50 µm), mais également au centre de la pastille (Figure 5-32, 3 semaines, en haut au centre). Ces cristaux centraux sont beaucoup plus hétérogènes en taille, et globalement beaucoup plus petits (~ 1 µm). Leur morphologie diffère également, les petits cristaux se présentant sous forme de plaquettes, au contraire des gros cristaux qui se présentent sous la forme de COM. La dernière série d'images (Figure 5-32 (en bas), 3 semaines) montre l'état général de la pastille. On remarque très bien la formation de COM sur les parties non frittées de la pastille. L'image à droite montre l'état de la surface non frittée.

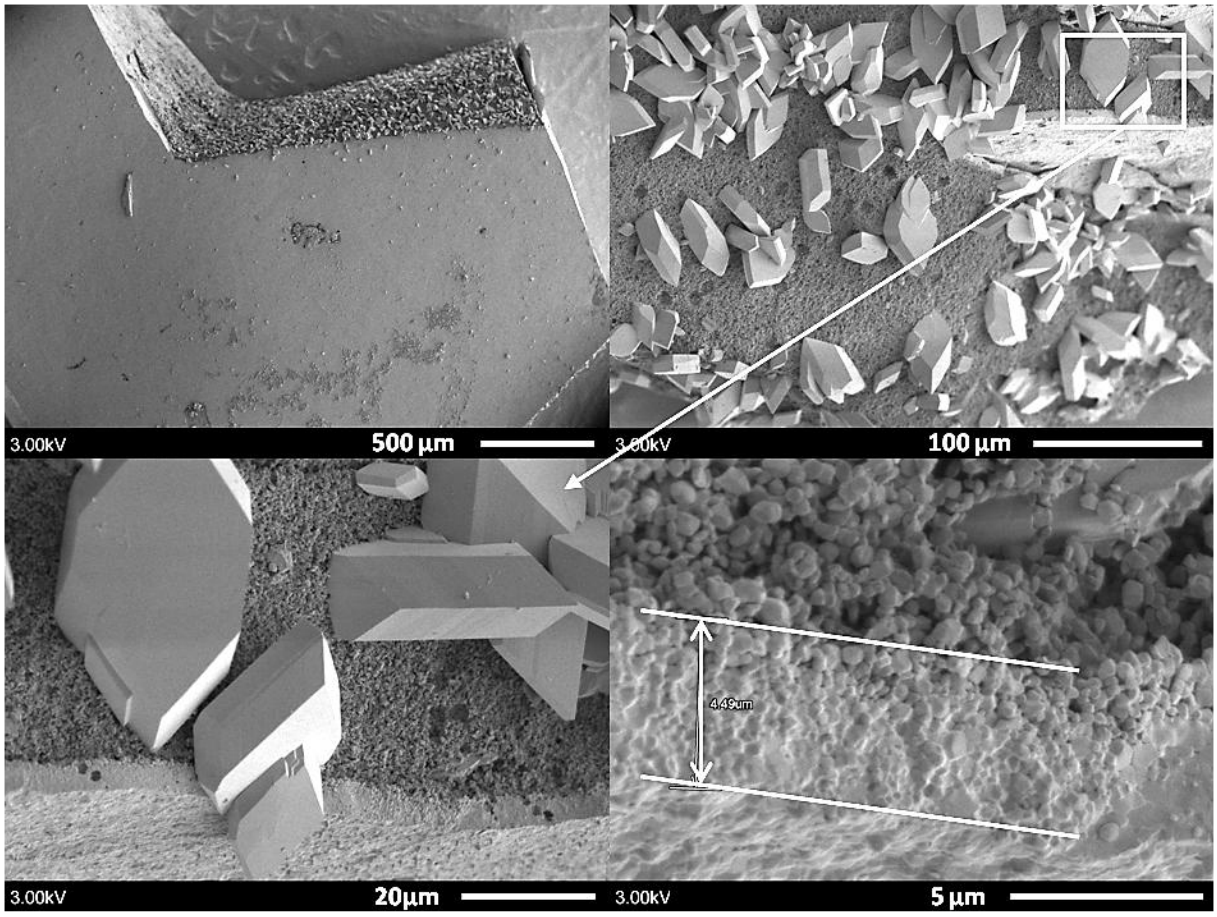



**Figure 5-33 : Images MEB des pastilles d'HAp immergées dans une solution aqueuse d'oxalates de sodium (0,010 mol.L$^{-1}$) et de citrates (0,001 mol.L$^{-1}$) pendant 3 semaines.**

La Figure 5-33 présente d'autres images obtenues par MEB pour une durée d'immersion de 3 semaines. Rappelons que dans le cas particulier de cette synthèse, la dissolution de la pastille d'HAp n'est pas favorisée particulièrement par le pH. Sur le cliché en haut et à gauche, il est clair que la surface exposée, frittée et donc très peu poreuse, ne présence quasiment pas de cristaux. Ce n'est pas le cas pour une surface beaucoup plus poreuse (cliché en haut et à droite). Le cliché en bas et à droite montre clairement la limite entre zones peu poreuse et poreuse.

### iv. *Synthèse en présence d'extrait de thé vert*

L'expérience d'immersion des pastilles d'HAp est effectuée désormais en présence d'extrait de thé vert. Le pH n'a pas été modifié : il correspond donc à celui de la solution d'oxalate de sodium dans l'extrait de thé (pH = 6,0). Pour cette manipulation, il faut garder en mémoire la présence d'oxalates dans l'infusion de thé (voir en particulier la Figure 5-30c).

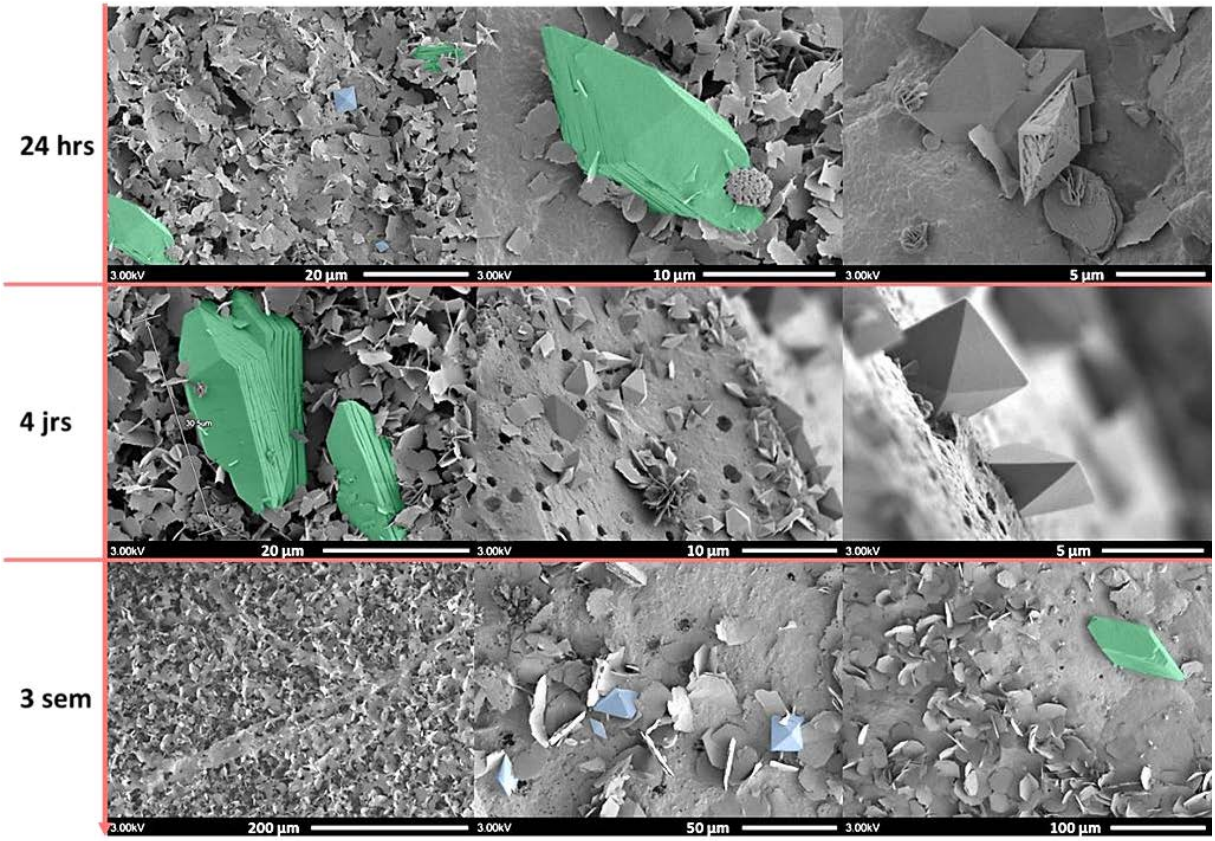



**Figure 5-34 : Images MEB des pastilles d'HAp immergées dans une solution d'oxalate de sodium (0,010 mol.L$^{-1}$) et en présence d'extrait de thé vert pendant : 24 heures, 4 jours et 3 semaines.**

Dès les premières 24 heures, on observe sur la surface d'HAp la présence de nombreux feuillets .On peut préciser que la filtration de l'infusion de thé après 3 semaines (4 jours également) donne une poudre composée de ces feuillets (environ 1,5 X 2,5 µm de surface et quelques nanomètres d'épaisseur) et de bipyramides (environ 3 µm de coté). Ces feuillets, absents de l'expérience de contrôle (voir Figure 5-30c), sont donc obligatoirement issus de l'interaction entre les ions oxalates, les cations calcium issus de l'HAp et les molécules de thé présentes dans le milieu. Cela est confirmé par FTIR et leur signature correspondant à la phase de COM. Cet échantillon est donc identifié comme un mélange d'oxalates de calcium COM (feuillets) et COD (bipyramides). Les morphologies spécifiques du COT (en lamelles, en vert) et du COD (bipyramide, en bleu) sont également facilement mises en évidence. Au bout de 4 jours d'immersion, le feuilletage de la surface d'HAp gagne en importance, et un plus grand nombre de cristaux de COD sont présents. Une fois encore, on remarque sur le cliché le plus à droite que les bipyramides de COD sont "insérées" dans la surface d'HAp. Après 3 semaines, la majorité de la pastille est recouverte par des feuillets de COM. On repère néanmoins quelques cristaux de COD et de COT. Enfin, on peut mentionner une fois encore la

présence de perforations à la surface de l'HAp. De telles perforations avaient déjà été observées dans le cadre des expériences de contrôle, en absence d'ions oxalates (voir Figure 5-30).

### v. *Comparaison morphologique entre échantillons synthétiques et calculs rénaux*

Dans cette section, nous allons comparer les résultats morphologiques obtenus *in vitro* dans les paragraphes précédents avec les données de la littérature concernant principalement les calculs rénaux (y compris la plaque de Randall). Il n'est pas question ici d'affirmer que notre compréhension des phénomènes présents *in vivo* est désormais définitive. Nous notons seulement qu'il est possible, en contrôlant le milieu de synthèse, de s'approcher très significativement de situations rencontrées au niveau biologique. Les synthèses proposées sont de fait très simplifiées par rapport à la complexité des milieux biologiques (en particulier celui du rein), mais nous restons convaincu que de cette approche peuvent émerger des pistes de réflexion intéressantes. Nous commençons par comparer une plaque de Randall issue d'un calcul rénal et un mime synthétique décrit ci-dessus (paragraphe 2).

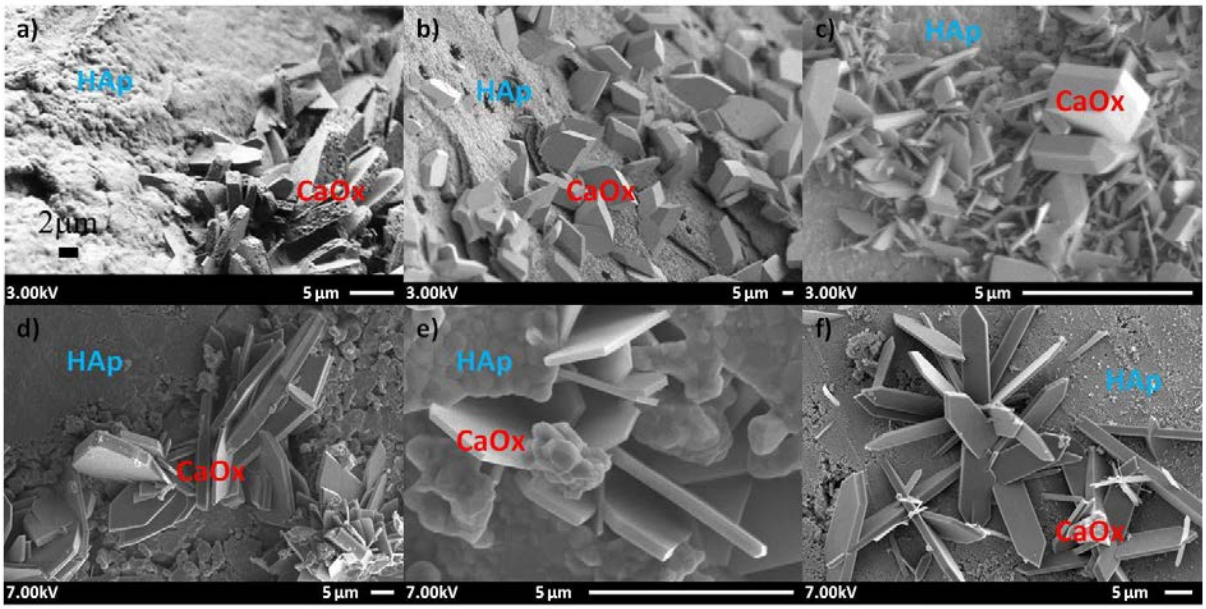



**Figure 5-35 : Images obtenues par MEB. a) Interface entre une plaque de Randall et des cristaux de COM d'après** [37]**. b), c) Cristaux de COM synthétisés à partir d'une pastille d'HAp en présence de citrates (paragraphe 2.b).iii Figure 5-32) .d), e) Cristaux de COM synthétisés sur HAp (frittée à 1050°C), [Ox] = $2{,}4.10^{-1}$ mol.L$^{-1}$ et f) Cristaux de COM synthétisés sur HAp (frittée à 800°C) à pH = 7,2 et [Ox] = $1.10^{-1}$ mol.L$^{-1}$.**

La Figure 5-35 présente côte à côte une plaque de Randall (Figure 5-35a) issue d'un calcul rénal et des cristaux de COM obtenus en surface d'une pastille d'HAp (Figure 5-35b). En termes de morphologie et d'ordre de grandeur de la taille des cristaux de COM, il ne fait aucun doute que le mime synthétique se rapproche de la situation réelle observée *in vivo*. Rappelons ici que la synthèse a été conduite en totale absence de source extérieure de sel de calcium, démontrant ainsi la dissolution partielle de la pastille initiale d'HAp. Cela conduit à la remise en solution d'une certaine partie des ions $Ca^{2+}$ et, consécutivement, à la cristallisation de la phase COM. A plusieurs reprises, nous avons observé que les cristaux (COM, COD et COD en fonctions des conditions opératoires – voir Figure 5-31 et Figure 5-34) étaient directement insérés dans la couche apatitique. Il en résulte qu'aucune relation cristallographique particulière entre l'HAp et l'oxalate de calcium considéré n'est

nécessaire pour la croissance cristalline. L'orientation aléatoire des cristaux de COM ne donne aucun indice sur la relation cristallographique entre le cristal HAp (hexagonale) et les cristaux de COM (monoclinique). Lonsdale [38] suggère des relations épitactiques possibles entre les deux phases. Cependant l'épitaxie ne semble pas être le mécanisme majoritaire ici [34], [39], de fait de la multitude d'orientations obtenue. Bien entendu, notre synthèse des pastilles d'HAp ne peut pas être considérée comme biomimétique, sachant que nous avons mis en œuvre un traitement thermique à très haute température. Cependant, les pastilles obtenues ont pu servir de "plateforme" de synthèse nous permettant d'évaluer l'influence de différents paramètres : nature du solvant, anions chélatants du calcium, extrait du thé vert … La simplicité de synthèse et de mise en forme de cette "plateforme" nous conforte dans l'idée de son utilité en physico-chimie, dans le domaine particulier de la précipitation des oxalates de calcium. Signalons enfin que tous nos essais de précipitation d'HAp à partir de COM se sont soldés par des échecs**.** Cette simple observation va dans le sens de la préexistence de la phase apatitique (plaque de Randall, donc) *avant* le phénomène de cristallisation des oxalates de calcium.

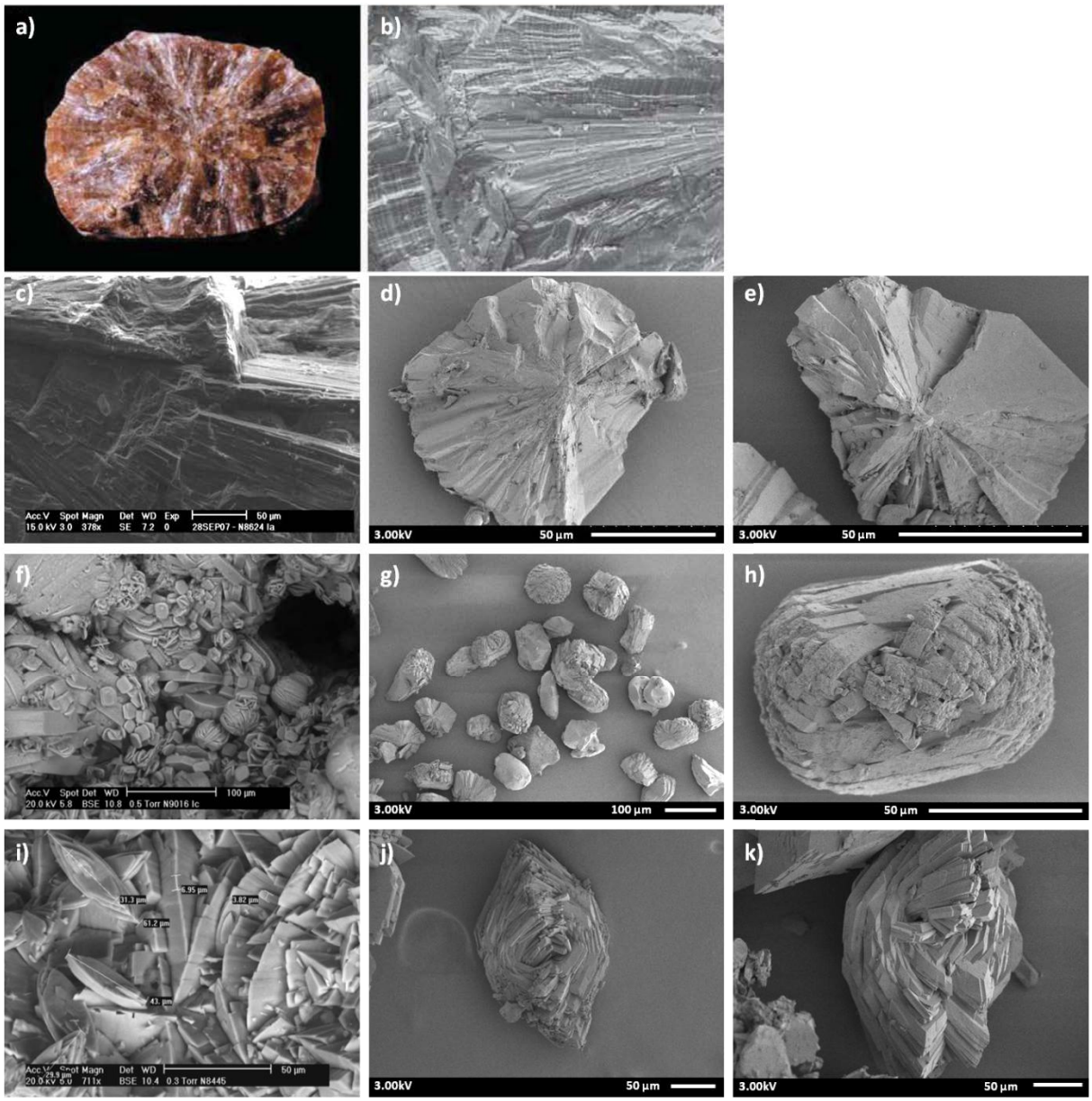



**Figure 5-36 : Images MEB. a) et b) Cristaux de COM observés dans un calcul rénal d'après** [7] **, c) Calcul rénal d'après** [40] **, d) et e) Cristaux de COM synthétisés dans un gel d'agar-agar (voir section 1.a).iii.), f) Cristaux de COM observés dans un calcul rénal d'après** [40]**, g) et h) Cristaux de COM synthétisés dans un gel d'agar-agar, i) Cristaux de COM observés dans un calcul rénal d après** [40]**, j) et k) Cristaux de COM synthétisés dans la gélatine (1 % en masse) avec des solutions de précurseurs préparées en présence d'une infusion de thé.**

Un autre exemple de similitude morphologique est présenté sur la Figure 5-36. Le cliché de la Figure 5-36a montre une coupe de calcul rénal, un zoom nous permet d'obtenir les Figure 5-36b et 36c. On peut rapprocher sa morphologie (structure rayonnante convergeant vers un point central) à des cristaux obtenus dans une des synthèses en gel (agar-agar). D'après Daudon *et coll.* [7], ce type d'assemblage particulier de cristaux de COM est typique d'un calcul idiopathique de whewellite : ils ne se forment donc *a priori* pas dans des conditions particulières. La Figure 5-36f montre un autre type de morphologie, cet assemblage est assimilable à une "pelote de laine". De fait, on observe de tels assemblages dans le cas d'une synthèse de COM dans un gel d'agar-agar (voir paragraphe 1.a).iii. et Figure 5-36g et 36h). *In vivo*, on retrouve cette morphologie particulière dans le cas de calculs

rénaux de patients atteints d'hyperoxalurie primaire de type 1. Cette maladie induit une hyperoxalurie génétique qui différencie le mécanisme de formation des calcifications (d'où cette morphologie en forme de « pelote »). Lors d'une même expérience en gel, un grand nombre de morphologies différentes a parfois été mis en évidence (synthèse dans l'agar-agar, Figure 5-36d, 36e, 36g et 36h). Cela peut s'expliquer par des conditions physicochimiques locales différentes, tantôt en hyperoxalurie (Figure 5-36g et 36h), tantôt en conditions stœchiométriques (Figure 5-36d et 36e). Enfin la Figure 5-36i montre une morphologie beaucoup plus rare, en forme de « bateau ». Ce type d'assemblage est beaucoup moins fréquent et reflète probablement la formation de calculs « transitoires » avec une cristallisation rapide sur une courte période de temps. On retrouve cette morphologie le plus souvent sur une petite partie de la calcification et plus généralement dans son noyau. Dans nos synthèses, nous avons observé des cristaux en forme de « bateau » lors d'une expérience en gel avec des précurseurs préparés à base d'une infusion de thé, Figure 5-36j et 36k. Il est possible que les molécules actives de l'infusion de thé aient stabilisé cette morphologie particulière. On peut néanmoins noter la différence de taille des cristaux entre les clichés. A l'échelle macroscopique, une classification a été adoptée en fonction des morphologies. Cinq sous types de calculs de whewellite (COM) ont été définis [41] . Ces catégories permettent une meilleure identification pour la pathogénèse et donc une meilleure compréhension des conditions de formation des calcifications. Il est assez surprenant de noter que la morphologie de COM la plus présente dans nos synthèses *in vitro* est celle que nous avons qualifiée de « pince à linge » alors que cette morphologie est totalement inexistante dans les calculs rénaux. En ce qui concerne le COD, il a été difficile voire même impossible de synthétiser des cristaux de taille supérieure à 10 µm.

La Figure 5-37 rend compte de la ressemblance entre les cristaux de COD synthétisés dans ce travail (Figure 5-37b) et un calcul rénal (identifié comme COD) plongé dans un milieu chélateur de calcium (infusion de thé) (Figure 5-37a).

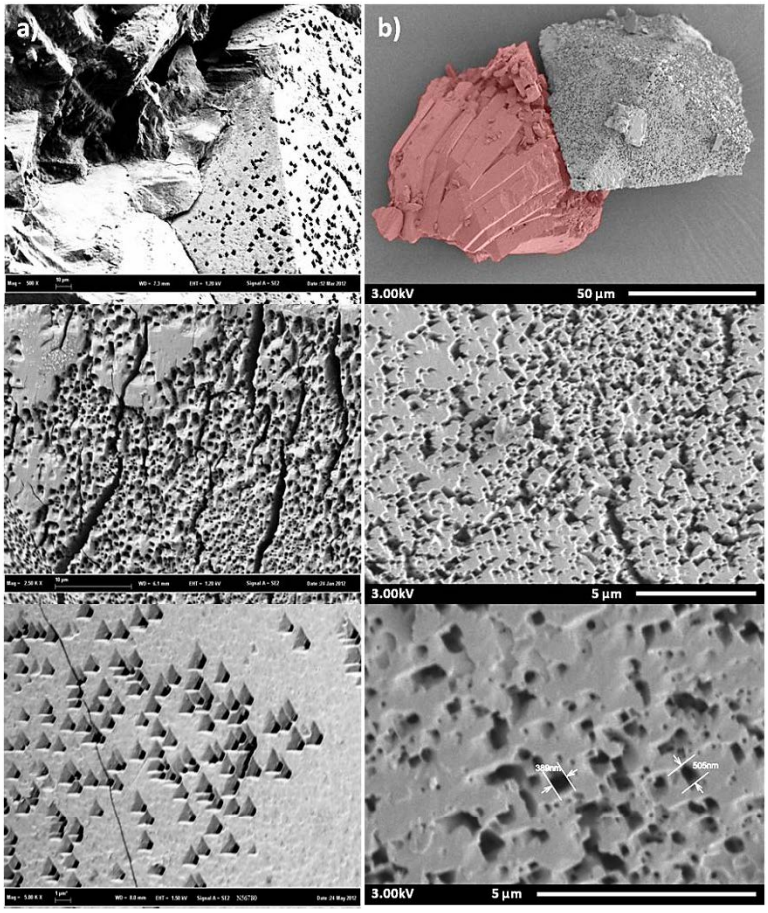



**Figure 5-37 : Images MEB. a) Calcul rénal COD plongé dans une infusion de thé vert, d'après** [4] **b) Cristaux de COD et COM (en rouge) synthétisés dans un gel d'agar-agar sans thé.**

En effet, de manière identique la surface semble être percée de cavités régulières de quelques centaines de nanomètres. Il se peut que le calcium soit consommé à partir de la surface par les ajouts : catéchines, ions citrates ou molécules d'agarose [42], [4], [28]. En plus d'avoir des propriétés diurétiques, le thé permet d'obtenir davantage de phase COD. Pour se faire, l'extrait de thé inhibe la formation de la phase COM (stable thermodynamiquement) et chélate le précurseur de calcium pour conduire vers la formation de la phase dihydratée. Lorsque du thé est mis en présence du COD (post-synthèse), les catéchines, présentes dans l'infusion, vont dégrader les surfaces des bipyramides, que ce soit à partir d'échantillons de calculs rénaux (Figure 5-37a) où d'échantillons synthétiques (Figure 5-37b). D'après les travaux cités ([42], [4], [28]), lorsqu'un calcul de whewellite est mis en présence de thé, les catéchines permettent une transformation de la whewellite (COM) en weddellite (COD). Cependant ce résultat n'a pas été observé dans nos expériences. Il est intéressant de noter que contrairement au COD, la surface de COM n'est pas autant altérée (Figure 5-37b en rouge) dans cette expérience. Globalement, les catéchines du thé permettent : ***(i)*** d'inhiber la cristallisation de la phase COM, ***(ii)*** de favoriser la cristallisation de la phase COD, ***(iii)*** de dégrader les cristaux préexistants de COM et de COD. Les cristaux de weddellite (COD) semblent présenter une moins bonne adhérence aux tissus biologiques des reins [28], ce qui permet une meilleure élimination contrairement à la whewellite. Les catéchines du thé semblent, *a priori*, une alternative potentielle au traitement des calcifications pathologiques.

## 3. Synthèses en conditions microfluidiques

### a) Contexte des travaux

Comme expliqué dans l'Introduction, le néphron est l'unité structurale et fonctionnelle du rein composé d'un réseau complexe de canaux (Figure 5-38). Les lithiases urinaires peuvent se former dans la partie distale de la structure du rein, le tube collecteur, qui est la zone où se concentrent les urines. On rencontre également des calcifications ectopiques ou tissulaires de type plaque de Randall, ou la nucléation/croissance des oxalates de calcium se fait à partir d'une matrice hybride organique/inorganique composée de fibres protéiques couvertes de sphérules d'apatite présentes dans les tissus.

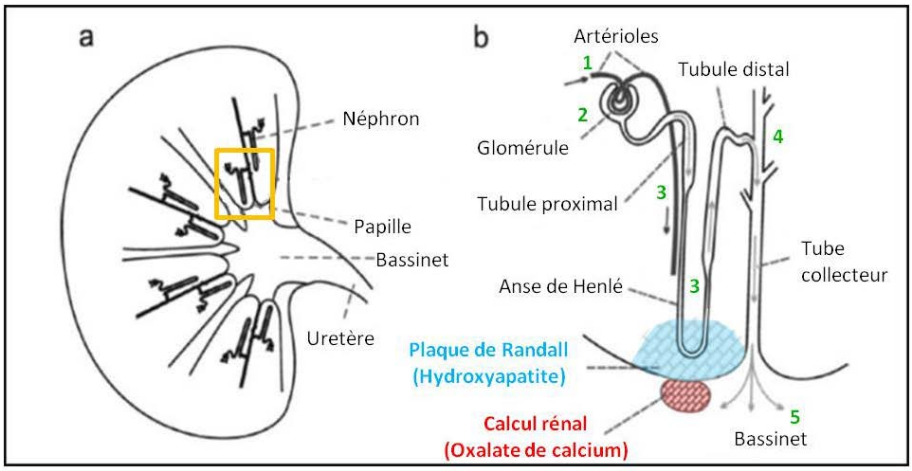



**Figure 5-38 : Schéma a) d'une coupe de rein et b) d'un néphron (modifié d'après [34]).**

Les débits considérés dans les tubules des néphrons sont de l'ordre de 0,3 ml.min$^{-1}$ à 10 ml.min$^{-1}$ avec autour de 200000 à 2,5 millions de néphrons par rein [43]. Si l'on considère que 10 néphrons donnent naissance à un tube collecteur, le débit dans le tube collecteur serait de 10,0 nl.min$^{-1}$. Chez l'homme, les tubes collecteurs (en sortie de néphrons) ont un diamètre de l'ordre de 100 µm [44]. Un calcul simple du nombre de Reynolds montre ici que les régimes d'écoulements sont essentiellement laminaires (Re << 2000). De ce fait, la cristallisation dans le rein est contrôlée par diffusion des espèces ioniques. De plus, la cristallisation *in vivo* se fait sur des processus longs à l'échelle de l'expérience de laboratoire (quelques heures à quelques semaines) avec un apport renouvelé de solutions qui maintient localement la sursaturation.

Dans les urines, les concentrations physiologiques en calcium et oxalate sont comprises entre 0,1 et 10 mM. On note la présence d'inhibiteurs de croissance dans les fluides biologiques qui vont entrainer des processus de nucléation lents. Ces concentrations ne sont pas constantes et ont tendances à varier en fonction du régime alimentaire du patient. En d'autres termes, les facteurs de sursaturation sont faibles et la prédominance des surfaces des parois sur le volume de fluide biologique peuvent favoriser les mécanismes de nucléation hétérogène dans le néphron. Cette supposition est particulièrement justifiée dans le cas des plaques de Randall qui jouent un rôle de « catalyseur » de nucléation au niveau des parois tissulaires [33].

Nous proposons ici une approche microfluidique pour modéliser les écoulements dans le tube collecteur du néphron. Un montage en « Y » avec injection de chacun des précurseurs ($CaCl_2$ et

$Na_2C_2O_4$) dans chaque branche du Y a été développé. Les résultats ont donné lieu à la publication d'un article présenté ci-dessous.

b) Résultats obtenus en synthèse microfluidique

Published on 29 February 2016. Downloaded by Ecole Sup de Physique et de Chimie Industrie on 14/03/2016 16:10:06.

Lab on a Chip

COMMUNICATION

View Article Online
View Journal

Cite this: DOI: 10.1039/c6lc00197a

Received 11th February 2016,
Accepted 29th February 2016

DOI: 10.1039/c6lc00197a

www.rsc.org/loc

# Calcium oxalate precipitation by diffusion using laminar microfluidics: toward a biomimetic model of pathological microcalcifications†

G. Laffite,[ab] C. Leroy,[b] C. Bonhomme,[b] L. Bonhomme-Coury,[b] E. Letavernier,[c] M. Daudon,[c] V. Frochot,[c] J. P. Haymann,[c] S. Rouzière,[d] I. T. Lucas,[e] D. Bazin,[bd] F. Babonneau[b] and A. Abou-Hassan*[a]

The effect of mixing calcium and oxalate precursors by diffusion at miscible liquid interfaces on calcium oxalate crystalline phases, and in physiological conditions (concentrations and flow rates), is studied using a microfluidic channel. This channel has similar dimensions as the collection duct in human kidneys and serves as a biomimetic model in order to understand the formation of pathological microcalcifications.

During the last decades, epidemiological studies have suggested an increased frequency of kidney stone (KS) diseases affecting up to 10% of the industrialized population.[1] Nowadays, most of the kidney stones are made of calcium oxalate (CaOx) crystalline aggregates.[2] Due to these alarming perspectives, a large number of investigations have been dedicated to *in vitro* crystallisation methods.[3] Their aim is to study the impact of local physico-chemical variations on the formation of the stable CaOx monohydrated form whewellite (calcium oxalate monohydrate, COM) or the less stable CaOx dihydrated form weddellite (calcium oxalate dihydrate, COD). However, some studies pointed out the fact that the morphology and the nature of CaOx phases could be significantly affected by the flow procedure used for precipitation.[4]

Indeed, CaOx crystals leading to stones appear at the end of the collecting duct, which is the most distal part of the kidney tubular structure responsible for urine concentration.[3c] The human diuresis (urine secretion) varies between 0.3 ml $min^{-1}$ and 10.0 ml $min^{-1}$ with an average nephron (urine forming unit) number ranging from approximately 200 000 to more than 2.5 million in human kidneys.[5] Considering that about 10 nephrons give birth to one single collecting duct, the flow rate inside one collecting duct is around 10.0 nl $min^{-1}$ under a standard diet in human beings. Such a flow rate is in the order of magnitude to those injected in microsystems. Moreover in humans the diameter of a collecting duct is ≈100 μm (which can be easily mimicked using microchannels).[6] It follows that urine flow is laminar in collecting ducts.[7] Finally, it is anticipated that KS growth kinetics should be mainly controlled by diffusion gradients in a state of continuous flow with a constant replenishment of oxalate and calcium solutions (*i.e.* maintaining a constant supersaturation (SS) state). Such gradients can be easily reproduced using a microfluidic channel. In conclusion, it appears clear that a biomimetic model using microfluidics can be built to mimic the conditions for CaOx precipitation in kidneys.

Due to their small dimensions, flows are laminar in continuous microfluidic devices and mixing occurs by molecular diffusion at the dynamic interfaces of two or several miscible liquids. Previously, the laminarity of the flow has been used to generate structures by patterning of metals, organic polymers, inorganic crystals, and ceramics at interfaces.[8] Moreover a laminar microfluidic device offers great potential to mimic organs on chips.[9] For instance, Wei *et al.*[10] developed a bio-inspired kidney model to understand the molecular and pharmacological basis of calcium phosphate stone formation in the epithelial or other similar cellular microenvironments. To the best of our knowledge, investigating the effect of diffusive mixing on the crystalline phases of calcium oxalate obtained at miscible liquid–liquid dynamical interfaces in a microfluidic device and in the physiological

[a] *Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8234 CNRS, Laboratoire Physico-chimie des Electrolytes et Nanosystèmes Interfaciaux (PHENIX), 4 place Jussieu - case 51, F-75005, Paris, France. E-mail: ali.abou_hassan@upmc.fr*
[b] *Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Collège de France, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), 11 Place Marcelin Berthelot, Bat D, F-75005, Paris, France*
[c] *Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, AP-HP, INSERM, Service d'Explorations Fonctionnelles, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020, Paris, France*
[d] *Laboratoire de Physique des Solides, CNRS UMR 8502, Université Paris-Sud, Bât 510, 91405, Orsay, France*
[e] *Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8235 CNRS, Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (LISE), 4 place Jussieu – case 133, F-75005, Paris, France*

† Electronic supplementary information (ESI) available: Chemicals, microfluidic device fabrication, COMSOL simulations, and experimental results (FT-IR and XRD). See DOI: 10.1039/c6lc00197a

Published on 29 February 2016. Downloaded by Ecole Sup de Physique et de Chimie Industrie on 14/03/2016 16:10:06.

conditions (concentrations and flow rates) has never been reported. Such a biomimetic model is important in order to understand the formation of pathological microcalcifications.

The principles of our experimental approach are illustrated in Fig. 1a. The upper part of the device is composed of a "Y-shaped" polydimethylsiloxane (PDMS) microchannel where calcium and oxalate precursor solutions are injected through separated inlets in the microchannel, mixed by molecular interdiffusion at the interface and resulting in the precipitation of CaOx crystals in the interdiffusion zone.

The initial mold used for PDMS replication is fabricated using a standard soft lithography process described in ESI.† The microchannel dimensions are fixed to 5 cm in length, 100 μm in width and 100 μm in depth to correctly mimic a collecting duct in human kidneys. In contrast to the standard elastomer-based device fabrication process, we selected a reversible sealing assembly[11] in order to remove the upper PDMS part from the flat support substrate. For that purpose, we manufactured a specific metallic holder to maintain mechanically a homogeneous compression between both parts of the microchannel and to avoid any leakage (see Fig. 1b). This technological solution is selected for several purposes: first, the very small amount of synthesized crystals (a maximum quantity of 1 mg could be obtained in a hypothetic integral filling of the microchannel) is not suitable for *ex situ* analyses such as $^{13}C$ solid state NMR in natural abundance. As a consequence, it is of paramount importance to characterize the crystals directly inside the microchannel. Secondly, the reversible sealing assembly is not limited to standard materials (PDMS, flat glass or silicon) to close the microchannel on the bottom part. Microscope glass slides have been selected for X-ray diffraction (XRD) analysis and for observations using field emission scanning electron microscopy (SEM) as well as for Raman scattering experiments. Although coupling these techniques to microfluidic systems have been described separately using different geometries and materials due to the requirements of each technique,[12] herein the reversibility of our microfluidic system allows us to undergo different characterizations on the same channel as well as the same sample without any technical limitations, thus avoiding the problems of reproducibility from one channel to another.

To initiate the precipitation of the CaOx crystals, the two inlets of the microchannel were filled with a calcium chloride aqueous solution at 12.0 mmol $L^{-1}$ and a sodium oxalate aqueous solution at 0.40 mmol $L^{-1}$, respectively. These concentrations correspond to hypercalciuria and moderate hyperoxaluria, which are frequent settings in kidney stone formers and relate statistically to the presence of both COM and COD phases in patient urine and stones.[3c] Two syringe pumps (Harvard apparatus, Pico 11 plus) were used to inject both precursors with flow rates set to 1 μl $min^{-1}$. After 2 hours at room temperature (22 °C), a dark conic shaped film appeared at the dynamic interface in the zone of molecular interdiffusion. Precipitation progressively increased toward the outlet (see Fig. 1c). At the end of the experiment, both parts of the microchannel are retrieved from the metallic holder. The glass slide support (with the CaOx crystals) is rinsed thoroughly with deionized water and ethanol. Finally, the slides were stored at 4 °C to limit the transformation of the unstable COD phase into the stable COM phase.

SEM observations performed on the channel walls such as in Fig. 2 show different crystal shapes and sizes (ranging from 1 to 20 μm), depending on the lateral position (perpendicular to the flow) in the precipitation cone. Trying to rationalize qualitatively these observations, the concentration of each precursor and the resulting SS (see ESI† for the definition and Fig. S1–S3) gradients established due to diffusion under laminar flow in the microchannel were calculated using COMSOL multiphysics. Nucleation and growth of CaOx involve homogeneous and heterogeneous phenomena and have been largely studied in different media including

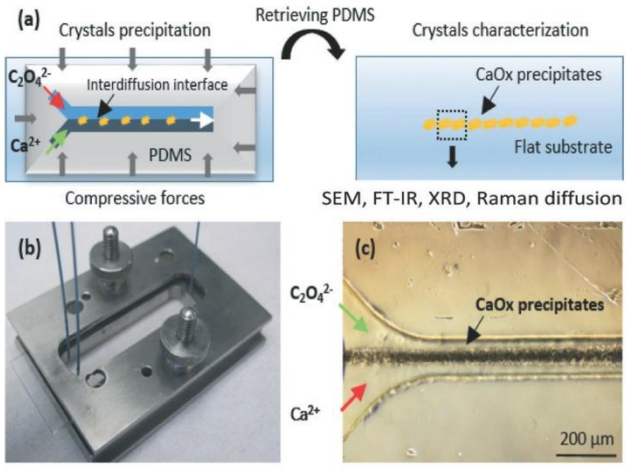



**Fig. 1** a) Principle of the dismountable two-phase laminar flow microfluidic device used for the synthesis and characterization of precipitated CaOx crystals. b) Image of the microfluidic device assembled within the compressive metallic holder. c) Optical micrograph showing the "conic shape" precipitation of CaOx crystals at the dynamic interface in the zone of molecular interdiffusion.

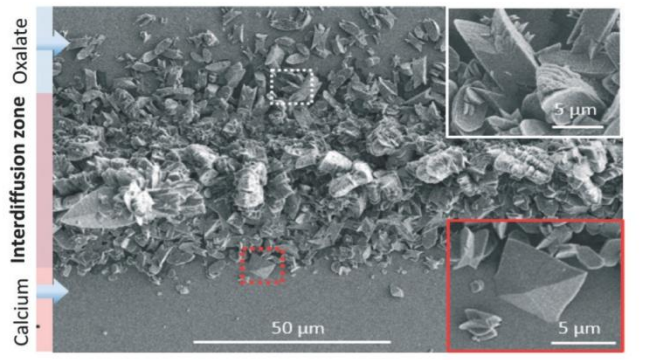



**Fig. 2** SEM image of precipitated crystals obtained in the microfluidic device from oxalate and calcium solutions at the dynamic interface. The white inset shows a zoom of the upper part of the precipitate containing twinned crystals. The red inset shows a zoom of the lower part of the precipitate containing mixed twinned and tapered bipyramid crystals.


This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

Published on 29 February 2016. Downloaded by Ecole Sup de Physique et de Chimie Industrie on 14/03/2016 16:10:06.

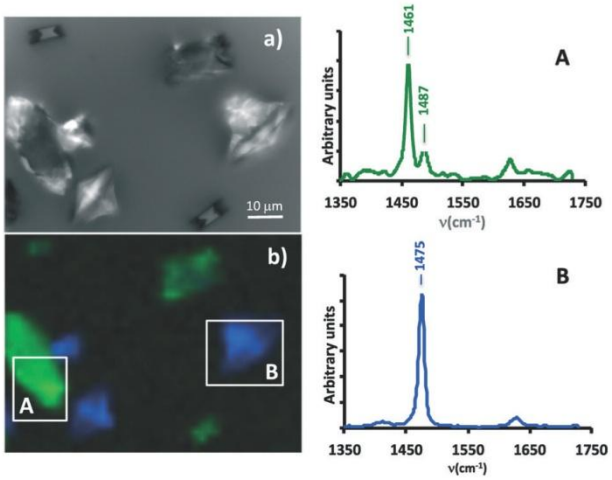



**Fig. 3** a) Optical image of a portion of the microchannel, and b) corresponding Raman mapping for two spectral regions, 1452–1468 $cm^{-1}$ in green and 1470–1480 $cm^{-1}$ in blue. The Raman spectra A and B correspond to the A and B zones indicated in b).

artificial and natural urine.[13] It is well accepted that the driving force of CaOx nucleation is the SS. When SS ≫ 1 and in the zone of unstable SS, CaOx nucleates and grows.[13b] As can be seen in Fig. 2 the biggest crystals of CaOx are located at the centre of the precipitate, *i.e.* in the middle of the channel where the SS is at a maximum (ESI,† Fig. S3). From the center to each edge, a gradual decrease of crystal sizes is observed which is correlated as well to a progressive decrease of oxalate (or calcium) concentrations and consequently of SS. Outside the precipitation cone, no nucleation is observed because the supersaturation regime was not reached. In the upper region of the image (rich in oxalate), a majority of twinned crystals representative for the COM phase were observed (see white inset in Fig. 2).[14] In terms of physiology, this condition corresponds to a low calciuria with a moderate hyperoxaluria inducing more frequently the predominant occurrence of the COM phase in patient stones.[3c] In the lower region of the image bipyramids (representative for the COD phase), were additionally observed.[15] At that location, the oxalate concentration is lower than the calcium concentration, which physiologically corresponds to hypercalciuria with a low oxaluria inducing indeed the presence of the COD phase in patient urine stones more frequently.[3c]

XRD diffraction experiments were performed on the precipitate obtained on a microscope glass slide, which is not the best suited substrate due to high scattering: only the COM phase was clearly identified as presented in ESI† (Fig. S4). ATR FT-IR spectra of the precipitated crystals were also recorded in the upper and lower regions of the microchannel (see Fig. S5 in ESI†): the resulting spectra confirm the presence of the COM phase in the upper region, but fail to clearly identify the COD phase. Indeed, the identification of COM and COD in a mixture has been reported to be difficult to establish by FT-IR, especially when one compound (COM) is in excess.[16] Furthermore, the low signal to noise inherent with the ATR-FT-IR imaging system that was used didn't help for this purpose.

We thus decided to rely on Raman scattering experiments to distinguish COM and COD phases, which is rather straightforward with this spectroscopy since COM is characterized by two Raman bands at 1463 and 1490 $cm^{-1}$, while COD presents only one Raman band in this frequency range, at 1472 $cm^{-1}$.[17] A portion of the microchannel where the two crystal morphologies found by SEM could be seen (Fig. 3a) was imaged thanks to a Raman microscope (Fig. 3b). The two types of crystals, twinned crystals (A zone) and bipyramids (B zone) indeed correspond to two different Raman spectral responses that are in total agreement with COM and COD phases, respectively. Raman mapping is indeed a powerful technique to distinguish between the two CaOx phases present in the microchannel and definitely strengthen the interpretation proposed from the SEM experiments.

In this work, the effect of mixing by interdiffusion on calcium oxalate crystalline phases from calcium and oxalate precursors at miscible liquid interfaces and under physiological conditions (concentrations and flow rates) was studied using a microfluidic channel. Such a channel had similar dimensions as the collection duct in human kidneys and acted as a biomimetic model in order to understand the formation of pathological microcalcifications. Moreover due to the versatility of the microsystem, structural characterizations on the CaOx crystals in the microchannel could be performed using SEM, ATR FT-IR, Raman diffusion and XRD techniques. In agreement with observations related to urinary lithiasis in patients, the variation in oxalate and calcium concentrations along the lateral section of the microchannel oriented the preferential formation of COM or COD phases. These preliminary results highlighted the potential of microfluidic devices to obtain crystalline phases relevant to human pathological calcifications. Moreover, our microfluidic approach opens up new opportunities to study the mechanisms leading to the first steps of kidney stone formation in collecting ducts. In the near future, the influence of various physico-chemical parameters such as the role of biological fluids (urea, ionic salts…) and growth inhibitors (citrate, catechine…) will be investigated quantitatively.

## Acknowledgements

This work was supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme (ANR-11-IDEX-0004-02), and more specifically within the framework of the Cluster of Excellence MATISSE led by Sorbonne Universités. The authors acknowledge LabEx MICHEM (Sorbonne Universités) for the use of nano/micro-Raman facilities.

## References

1 V. Romero, H. Akpinar and D. G. Assimos, *Rev. Urol.*, 2010, **12**, e86–e96.

Published on 29 February 2016. Downloaded by Ecole Sup de Physique et de Chimie Industrie on 14/03/2016 16:10:06.

2 E. M. Worcester and F. L. Coe, *N. Engl. J. Med.*, 2010, **363**, 954–963.
3 (*a*) F. Grases, A. Costa-Bauza, I. Gomila, M. Ramis, A. Garcia-Raja and R. M. Prieto, *Urol. Res.*, 2012, **40**, 41–46; (*b*) D. Milošević, D. Batinić, P. Konjevoda, N. Blau, N. Štambuk, L. Nižić, K. Vrljičak and D. Batinić, *J. Chem. Inf. Model.*, 2003, **43**, 1844–1847; (*c*) M. Daudon, P. Jungers and O. Traxer, *Lithiase urinaire*, Medecine Sciences Publications, Paris, 2012.
4 (*a*) J. P. Kavanagh, *Urol. Res.*, 2006, **34**, 139–145; (*b*) B. Bohner, G. Schuszter, O. Berkesi, D. Horvath and A. Toth, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 4289–4291.
5 J. F. Bertram, R. N. Douglas-Denton, B. Diouf, M. D. Hughson and W. E. Hoy, *Pediatr. Nephrol.*, 2011, **26**, 1529–1533.
6 P. D. Vize, A. S. Woolf and J. B. L. Bard, *The kidney: from normal development to congenital abnormalities*, Elsevier Science/Academic Press, Amsterdam, 2003.
7 P. Tabeling, *Introduction to Microfluidics*, Oxford University Press, Reprint edition, 2010.
8 (*a*) P. J. A. Kenis, R. F. Ismagilov and G. M. Whitesides, *Science*, 1999, **285**, 83–85; (*b*) A. Yashina, F. Meldrum and A. deMello, *Biomicrofluidics*, 2012, 6.
9 S. N. Bhatia and D. E. Ingber, *Nat. Biotechnol.*, 2014, **32**, 760–772.
10 Z. Wei, P. K. Amponsah, M. Al-Shatti, Z. Nie and B. C. Bandyopadhyay, *Lab Chip*, 2012, **12**, 4037–4040.
11 A. Konda, J. M. Taylor, M. A. Stoller and S. A. Morin, *Lab Chip*, 2015, **15**, 2009–2017.
12 (*a*) M. V. Barich and A. T. Krummel, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 10000–10003; (*b*) R. Barrett, M. Faucon, J. Lopez, G. Cristobal, F. Destremaut, A. Dodge, P. Guillot, P. Laval, C. Masselon and J. B. Salmon, *Lab Chip*, 2006, **6**, 494–499; (*c*) A. F. Chrimes, K. Khoshmanesh, P. R. Stoddart, A. Mitchell and K. Kalantar-zadeh, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 5880–5906; (*d*) B. Lehmkuhl, S. D. Noblitt, A. T. Krummel and C. S. Henry, *Lab Chip*, 2015, **15**, 4364–4368.
13 (*a*) F. J. Opalko, J. H. Adair and S. R. Khan, *J. Cryst. Growth*, 1997, **181**, 410–417; (*b*) B. Finlayson, *Kidney Int.*, 1978, **13**, 344–360; (*c*) J. M. Baumann and B. Affolter, *World J. Nephrol. Urol.*, 2014, **3**, 256–267.
14 A. Millan, *Cryst. Growth Des.*, 2001, **1**, 245–254.
15 R. C. Walton, J. P. Kavanagh, B. R. Heywood and P. N. Rao, *J. Cryst. Growth*, 2005, **284**, 517–529.
16 P. Carmona, J. Bellanato and E. Escolar, *Biospectroscopy*, 1997, **3**, 331–346.
17 C. Conti, M. Casati, C. Colombo, E. Possenti, M. Realini, G. D. Gatta, M. Merlini, L. Brambilla and G. Zerbi, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2015, **150**, 721–730.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

## 4. Conclusion

Au cours du Chapitre 5, nous avons développé et adapté des synthèses se rapprochant des conditions prévalant *in vivo*. Le but premier était tout d'abord d'obtenir des cristaux de taille importante présentant des morphologies définies (« pince à linge » pour le COM et bipyramides pour le COD) afin d'étudier l'impact de différents chélatants tels que l'ion citrate ou les catéchines du thé. L'utilisation de ces chélatants a dans un premier temps été étudiée à partir des synthèses en goutte à goutte telles que présentées dans le Chapitre 1. Ces ajouts ont permis l'obtention de bipyramides de COD que nous ne pouvons obtenir par synthèse classique.

Les synthèses en gel nous ont permis d'atteindre le premier objectif, à savoir l'obtention de cristaux de grande taille. Cependant, la plupart de ces gels se sont avérés non inertes vis-à-vis des cristaux formés. De plus, nous avons pu mettre en évidence l'incorporation de la matrice de croissance lors des synthèses au sein même de certains des cristaux formés. Ceci démontre la diversité des mécanismes de cristallisation pour une même expérience (incorporation ou non du gel) et donc l'hétérogénéité des morphologies et des phases formées. L'obtention de mésocristaux de COM a pu être obtenue par densification du gel de synthèse ainsi que par l'augmentation de la croissance en homo-épitaxie (et ce grâce à l'incorporation de macromolécules compensant les défauts du réseau cristallin).

Les expériences présentées dans ce Chapitre ont soulevé d'autres questions concernant les compositions locales de cristallisation. En effet il est connu que l'hypercalciurie favorise la formation de COD alors que l'hyperoxalurie favorise la cristallisation du COM (avec une morphologie particulière en « pelote »). Or, il n'a pas été rare d'obtenir lors d'une même expérience les deux phases d'oxalates de calcium, prouvant ainsi des différences « d'environnements locaux » lors de leur formation. L'hypercalciurie et l'hyperoxalurie sont donc des paramètres de cristallisation qui ont une influence extrêmement importante sur la phase d'oxalate obtenue. Grâce aux synthèses en gel, nous avons pu obtenir des cristaux micrométriques présentant des morphologies proches de celles rencontrées couramment dans des calcifications. Afin de nous rapprocher encore plus des conditions de calcification, nous avons tenté de synthétiser des oxalates de calcium à partir d'une pastille d'HAp synthétique. L'idée était ici de mimer la nucléation de la whewellite (COM) sur la plaque de Randall. Fort du succès de cette approche, nous avons ensuite mis en jeu des ions citrates et des molécules extraites du thé vert. Les résultats ont montré des croissances hétérogènes mimant de façon surprenante la plaque de Randall et les cristaux d'oxalate associés.

Enfin nous avons réalisé, en collaboration avec le laboratoire Phenix (Physicochimie des Electrolytes et Nanosystèmes interfaciaux), des synthèses dans des conditions microfluidiques (écoulement laminaire). Cela permet une nouvelle fois de nous rapprocher de conditions *in vivo* en nous plaçant dans le même type de confinement que celui d'un tube collecteur du rein. Ces expériences ont mis en évidence la possibilité de nucléation homogène en fonction de la supersaturation des ions impliqués. Récemment, des tests ont été effectués avec des ions citrates et de l'EDTA (fort complexant du calcium) afin de corroborer les observations expérimentales. Des expériences concernant l'ajout d'apatite et de collagène ont été également menées. Toutes ces perspectives nécessiteront un long travail exploratoire à venir.

## Bibliographie Chapitre 5 :


[1] H. Bek-Jensen, A. M. Fornander, M. a Nilsson, and H. G. Tiselius, “Is Citrate an Inhibitor of Calcium Oxalate Crystal Growth in High Concentrations of Urine?,” *Urol. Res.*, 24, 2, 67–71, **1996**.

[2] K. M. Kim, “Determinants of Weddellite Formation: Chondroitin Sulfates and Citrate Determine Weddellite Formation *in vitro*,” *Scanning Microsc.*, 10, 2, 445–455, **1996**.

[3] Z. Chen, C. Wang, H. Zhou, L. Sang, and X. Li, “Modulation of Calcium Oxalate Crystallization by Commonly Consumed Green Tea,” *CrystEngComm*, 12, 3, 845, **2010**.

[4] J. Rode, K. Benzerara, D. Bazin, A. Dessombz, E. Letavernier, A. Hoznek, O. Traxer, M. Daudon, and J.-P. Haymann, “Influence of Daily Green Tea Infusions on Hypercalciuric Renal Stone Patients: Biological and Morpho-constitutional Analysis,” *Eur. J. Clin. Invest.*, 46, Issue Supplement S1, 118, **2016**.

[5] V. S. Joshi, B. B. Parekh, M. J. Joshi, and A. B. Vaidya, “Herbal Extracts of Tribulus Terrestris and Bergenia Ligulata Inhibit Growth of Calcium Oxalate Monohydrate Crystals *in vitro*,” *J. Cryst. Growth*, 275, 1–2, e1403–e1408, **2005**.

[6] R. Backov, C. M. Lee, S. R. Khan, C. Mingotaud, G. E. Fanucci, and D. R. Talham, “Calcium Oxalate Monohydrate Precipitation at Phosphatidylglycerol Langmuir Monolayers,” *Langmuir*, 16, 14, 6013–6019, **2000**.

[7] M. Daudon, P. Jungers, D. Bazin, and P. Jungers, “Peculiar Morphology of Stones in Primary Hyperoxaluria,” *N. Engl. J. Med.*, 359, 1, 100–2, **2008**.

[8] H. Cölfen and M. Antonietti, “Mesocrystals: Inorganic Superstructures Made by Highly Parallel Crystallization and Controlled Alignment,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 44, 35, 5576–5591, **2005**.

[9] F. Nindiyasari, L. Fernández-Díaz, E. Griesshaber, J. M. Astilleros, N. Sánchez-Pastor, and W. W. Schmahl, “Influence of Gelatin Hydrogel Porosity on the Crystallization of $CaCO_3$,” *Cryst. Growth Des.*, 14, 4, 1531–1542, **2014**.

[10] C. Rochas, M. Lahaye, and W. Yaphe, “$^{13}C$ NMR Spectrocopic Investigation of Agarose Oligomers,” *Carbohydr. Res.*, 148, 199–207, **1986**.

[11] A. Ebrahimpour, L. Perez, and G. H. Nancollas, “Induced Crystal Growth of Calcium Oxalate Monohydrate at Hydroxyapatite Surfaces. The Influence of Human Serum Albumin, Citrate, and Magnesium,” *Langmuir*, 7, 3, 577–583, **1991**.

[12] J. J. De Yoreo, S. R. Qiu, and J. R. Hoyer, “Molecular Modulation of Calcium Oxalate Crystallization,” *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 291, 6, F1123–31, **2006**.

[13] P. A. Antinozzi, C. M. Brown, and D. L. Purich, “Calcium Oxalate Monohydrate Crystallization: Citrate Inhibition of Nucleation and Growth Steps,” *J. Cryst. Growth*, 125, 1–2, 215–222, **1992**.

[14] M. Daudon, C. Hennequin, and R. Marfaing, “Citrate,” *Cah. Form. Biochim.*, 99–107, **1996**.

[15] F. Nindiyasari, E. Griesshaber, L. Fernández-Díaz, J. M. Astilleros, N. Sánchez-Pastor, A. Ziegler, and W. W. Schmahl, “Effects of Mg and Hydrogel Solid Content on the Crystallization of Calcium Carbonate in Biomimetic Counter-diffusion Systems,” *Cryst. Growth Des.*, 14, 9, 4790–4802, **2014**.

[16] L. Chen, T. Ye, X. Jin, J. Ren, B. Huang, Z.-K. Xu, H. Chen, and H. Li, “Gel Network Incorporation into Single Crystals Grown by Decomplexation Method,” *CrystEngComm*, 17, 42, 8113–8118, **2015**.

[17] N. Gehrke, N. Nassif, N. Pinna, M. Antonietti, H. S. Gupta, and H. Cölfen, “Retrosynthesis of Nacre *via* Amorphous Precursor Particles,” *Chem. Mater.*, 17, 26, 6514–6516, **2005**.

[18] M. Hirose, T. Yasui, A. Okada, S. Hamamoto, H. Shimizu, Y. Itoh, K. Tozawa, and K. Kohri, “Renal Tubular Epithelial Cell Injury and Oxidative Stress Induce Calcium Oxalate Crystal Formation in Mouse Kidney: Cell Injury and Renal Crystal Formation,” *Int. J. Urol.*, 17, 1, 83–92, **2010**.

[19] Y. Itoh, T. Yasui, A. Okada, K. Tozawa, Y. Hayashi, and K. Kohri, “Preventive Effects of Green Tea on Renal Stone Formation and the Role of Oxidative Stress in Nephrolithiasis,” *J. Urol.*, 173, 1, 271–275, **2005**.

[20] M. J. Charrier, G. P. Savage, and L. Vanhanen, “Oxalate Content and Calcium Binding Capacity of Tea and Herbal Teas,” *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 11, 4, 298–301, **2002**.

[21] R. Hönow, K. L. R. Gu, A. Hesse, and R. Siener, “Oxalate Content of Green Tea of Different Origin, Quality, Preparation and Time of Harvest,” *Urol. Res.*, 38, 5, 377–381, **2010**.

[22] C. S. Yang, L. Chen, M.-J. Lee, D. Balentine, M. Chen Kuo, and S. P. Schantz, “Blood and Urine Levels of Tea Catechins after Ingestion of Different Amounts of Green Tea by Human Volunteers,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 7, 351–354, **1998**.

[23] M. Reto, M. E. Figueira, H. M. Filipe, and C. M. M. Almeida, “Chemical Composition of Green Tea (Camellia sinensis) Infusions Commercialized in Portugal,” *Plant Foods Hum. Nutr.*, 62, 4, 139–144, **2007**.

[24] A. Martínez-Richa and P. Joseph-Nathan, “Carbon-13 CP-MAS Nuclear Magnetic Resonance Studies of Teas,” *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 23, 3, 119–35, **2003**.

[25] S. J. Choi, S. Y. Park, J. S. Park, S. K. Park, and M. Y. Jung, “Contents and Compositions of Policosanols in Green Tea (Camellia sinensis) Leaves,” *Food Chem.*, 204, 94–101, **2016**.

[26] P. Valera, F. Pablos, and A. Gustavo González, “Classification of Tea Samples by Their Chemical Composition Using Discriminant Analysis,” *Talanta*, 43, 3, 415–9, **1996**.

[27] S. P. J. Namal Senanayake, “Green Tea Extract: Chemistry, Antioxidant Properties and Food Applications – A review,” *J. Funct. Foods*, 5, 4, 1529–1541, **2013**.

[28] Y. Benzerara, D. Bazin, M. Daudon, J.-P. Haymann, and J. Rode, “Catechin for Treating Renal Lithiasis,” WO 2015/025294 A1**2015**.

[29] B. Grohe, A. Taller, P. L. Vincent, L. D. Tieu, K. a Rogers, A. Heiss, E. S. Sørensen, S. Mittler, H. a Goldberg, and G. K. Hunter, “Crystallization of Calcium Oxalates is Controlled by Molecular Hydrophilicity and Specific Polyanion-Crystal Interactions,” *Langmuir*, 25, 19, 11635–46, **2009**.

[30] D. R. Uhlmann, B. Chalmers, and K. A. Jackson, “Interaction between Particles and a Solid-Liquid Interface,” *J. Appl. Phys.*, 35, 10, 2986–2993, **1964**.

[31] H. G. Tiselius, “The Role of Calcium Phosphate in the Development of Randall’s Plaques,” *Urol. Res.*, 41, 5, 369–377, **2013**.

[32] M. Daudon, “Épidémiologie Actuelle de la Lithiase Rénale en France,” *Ann. Urol. (Paris).*, 39, 6,

209–231, **2005**.

[33] D. Bazin, M. Daudon, C. Combes, and C. Rey, “Characterization and Some Physicochemical Aspects of Pathological Microcalcifications,” *Chem. Rev.*, 112, 10, 5092–5120, **2012**.

[34] I. Sethmann, B. Grohe, and H.-J. Kleebe, “Replacement of Hydroxylapatite by Whewellite: Implications for Kidney-Stone Formation,” *Mineral. Mag.*, 78, 1, 91–100, **2014**.

[35] H. C. Margolis and E. C. Moreno, “Kinetics of Hydroxyapatite Dissolution in Acetic, Lactic, and Phosphoric Acid Solutions,” *Calcif. Tissue Int.*, 50, 2, 137–143, **1992**.

[36] R. P. Shellis, M. E. Barbour, S. B. Jones, and M. Addy, “Effects of pH and Acid Concentration on Erosive Dissolution of Enamel, Dentine, and Compressed Hydroxyapatite,” *Eur. J. Oral Sci.*, 118, 5, 475–482, **2010**.

[37] M. Daudon and D. C. Bazin, “Application of Physical Methods to Kidney Stones and Randall’s Plaque Characterization,” in *Urolithiasis*, J. J. Talati, H.-G. Tiselius, D. M. Albala, and Z. Ye, Eds. London: Springer London, **2012**, 683–707.

[38] K. Lonsdale, “Epitaxy as a Growth Factor in Urinary Calculi and Gallstones,” *Nature*, 217, 56–58, **1968**.

[39] D. Bazin and M. Daudon, “Pathological Calcifications and Selected Examples at the Medicine–Solid-State Physics Interface,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 45, 38, 383001, **2012**.

[40] M. Daudon, D. Bazin, G. André, P. Jungers, A. Cousson, P. Chevallier, E. Véron, and G. Matzen, “Examination of Whewellite Kidney Stones by Scanning Electron Microscopy and Powder Neutron Diffraction Techniques,” *J. Appl. Crystallogr.*, 42, 1, 109–115, **2009**.

[41] M. Daudon, P. Jungers, D. Bazin, J. C. Williams, A. P. Evan, J. E. Lingeman, and J. a. McAteer, “Stone Morphology: Implication for Pathogenesis,” *AIP Conf. Proc.*, 1049, 199–215, **2008**.

[42] J. Rode, J.-P. Haymann, and D. Bazin, “Maladie Lithiasique : Influence de la Prise Quotidienne de Thé Vert.” .

[43] J. F. Bertram, R. N. Douglas-Denton, B. Diouf, M. D. Hughson, and W. E. Hoy, “Human Nephron Number: Implications for Health and Disease,” *Pediatr. Nephrol.*, 26, 9, 1529–1533, **2011**.

[44] P. D. Vize, A. S. Woolf, and J. B. L. Bard, *The Kidney : from Normal Development to Congenital Abnormalities*, Elsevier S. Amsterdam, **2003**.

# Conclusion générale

# Conclusion générale

Les travaux de cette thèse ont été largement exploratoires, tant en science des matériaux qu'en spectroscopie RMN/DNP. Un effort particulier a été porté sur l'analyse détaillée des phosphates et oxalates de calcium, dans le cadre plus large des calcifications pathologiques. La collaboration avec des praticiens à l'hôpital Tenon de Paris nous a permis d'identifier en effet certains « challenges » spectroscopiques qu'il nous a semblé intéressant de relever.

Sachant que le but ultime de notre démarche était de proposer une méthodologie RMN/DNP applicable à un ensemble de calcifications pathologiques (calculs rénaux, plaque de Randall), une large part de ce manuscrit est consacré à la synthèse de composés modèles, de type apatite substituée (en carbonates et en sodium) et oxalates de calcium (COM, COD, COT, ACO, COAnh). Les protocoles de synthèse ont été largement détaillés de façon à obtenir des phases « à façon » : composition chimique, morphologie, taille moyenne des cristaux. Plusieurs voies de synthèses ont été explorées : précipitation en voie aqueuse, croissance en gel, synthèses en présence de vapeurs d'ammoniac. Les cristaux et nanoparticules obtenus ont été systématiquement étudiés par différentes techniques complémentaires : DRX sur poudre, FTIR, MEB et RMN multinucléaire et multidimensionnelle. En particulier, nous avons démontré que la RMN $^{43}$Ca MAS à ultra-haut champ magnétique était une approche possible pour l'étude détaillée des composés contenant du calcium. La RMN $^{13}$C CP MAS nous a permis d'enregistrer des signatures spectroscopiques très caractéristiques pour COM, COD, COT, ACO et COAnh. Une assez grande variabilité du spectre $^{13}$C CP MAS de la phase COM en fonction du processus synthétique a été mise en évidence. Notons que dans ce cas, les caractérisations par FTIR et DRX sur poudre étaient strictement identiques. Ceci démontre que la spectroscopie RMN $^{13}$C est ici particulièrement sensible à de subtiles modifications locales de l'environnement chimique (ceci se traduit par des shifts de l'ordre de quelques fractions de ppm). Les études sous rotation MAS à fréquence variable ont clairement démontré des effets de température et/ou de pression nets sur les spectres de COM, COD et COT. COD et COT se transforment en COM de manière *irréversible* mais avec des chemins réactionnels différents. La phase COM se transforme de manière réversible en une phase, dont le spectre se rapproche de celui de la phase ACO très récemment publiée par *Hajir et coll.*. Les auteurs dénomment cette phase ACO sur la base de l'absence de pics de diffraction en DRX sur poudre. L'observation de pics $^{13}$C, certes élargis, mais relativement distincts indique qu'un *ordre local* existe.

Les principaux résultats spectroscopiques concernent la mise en place d'un protocole robuste d'études par DNP CP MAS. L'étude de nanoparticules d'apatite substituée par des ions $CO_3^{2-}$ et $Na^+$ a démontré que des gains en temps expérimentaux de l'ordre de $\sim 550$ pouvaient être facilement atteints pour peu que la préparation de l'échantillon soit optimisée. Des expériences « impossibles » à implémenter par RMN (haut champ) standard ont été rendues possibles grâce aux gains DNP. Nous citerons à titre d'exemples les expériences 2D $^{13}$C–$^{13}$C SPC5 et $^{1}$H–$^{43}$Ca HETCOR en *abondance naturelle* (pour $^{43}$Ca).

L'extension de l'approche DNP CP MAS à l'étude des phases d'oxalate de calcium hydraté (COM, COD, COT) a soulevé de nombreux problèmes relatifs au choix du « DNP juice ». Dans le cas de la phase COM, le mélange {TEKpol/d-TCE/TCE} s'est avéré être adéquat pour l'enregistrement très rapide de spectres 2D $^{1}$H–$^{13}$C HETCOR. Une très haute résolution sur les deux dimensions a permis de

donner une attribution complète des signaux ($^{1}$H, $^{13}$C) sur la base des 16 corrélations observées. A cette occasion (expériences à ~ 100 K), nous avons démontré que l'approche GIPAW, pour laquelle les calculs sont effectués à 0 K, prenait tout son sens.

Les acquis relatifs aux composés de référence ont été ensuite élargis à une étude préliminaire de calculs rénaux et de plaques de Randall. Nous avons en particulier démontré que l'approche DNP CP MAS était parfaitement adaptée à l'étude d'échantillons de faible masse comme a plaque de Randall *unique.* L'étude des KS par DNP CP MAS a mis en lumière la complexité de l'approche dans le cas de nano(bio)composites organiques-inorganiques. Le problème de la *quantification* de tels systèmes reste ouvert. Il en est de même des connectivités présentes au niveau des interfaces organiques-inorganiques. Des expériences très spécifiques $^{13}$C–$^{31}$P, $^{13}$C–$^{31}$P–$^{43}$Ca… devraient ouvrir de nombreuses pistes de réflexion dans un futur très proche.

Nous avons également tenté de nous rapprocher de conditions de synthèses « compatibles » avec la physiologie particulière des calcifications : synthèses en présence d'ions chélatants du calcium, des protéines (gélatine), synthèse en montage microfluidique. Nous sommes désormais à la tête d'une « plateforme » synthétique permettant de « manier » des cristaux de composition et de taille variables ; des faces cristallines particulières, des associations entre cristaux inorganiques et molécules organiques, des attaques chimiques ciblées *via* des ions chélatants voire des molécules naturelles.

Une fois encore, la caractérisation détaillée des interfaces organiques-inorganiques reste un objectif excitant. Des résultats préliminaires montrent que les spectres 1D $^{13}$C CP MAS des phases COM et COD subissent des élargissements qu'il est sans doute possible d'attribuer aux interactions entre phases minérales et molécules organiques/biologiques. Il est prévisible que de fortes différences au niveau de la *mobilité* caractéristique des composants existent : il en résulte de fortes variations concernant les valeurs de $T_1$, $T_{1\rho}$, $\tau_{CP}$ optimales lors de l'expérience CP *etc.* A ce titre, les méthodes d'*édition spectrale* que nous avons mises en place dans le cadre de l'étude des KS sera d'une utilité toute particulière. L'approche DNP CP MAS ouvre quant à elle de nombreuses perspectives quant à l'étude des matériaux issus de notre « plateforme » synthétiques.