
SYNTHESE ET CARACTERISATION DES POUDRES D'ANB

PARTIE A.

Cette partie porte sur la synthèse (et la calcination dans le cas du matériau de référence) des poudres d'ANB. La précipitation en voie aqueuse est la voie de synthèse qui a été envisagée.

II.1. L'élaboration des poudres

II.1.1. La synthèse des apatites nanocristallines biomimétiques

Les analogues de synthèse du minéral osseux ont été obtenus par précipitation en voie aqueuse. Les réactifs de départ, utilisés pour la synthèse des poudres, sont le nitrate de calcium tétrahydrate $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck, qualité : pour analyses, pureté : 99 %), et l'hydrogénophosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Carlo Erba, qualité : pour analyses, pureté : 98 %). La mise en solution des précurseurs dans l'eau déionisée ne pose pas de problème de dissolution.

La précipitation [Drouet2009] se fait à température ambiante (environ 22°C), entre une solution aqueuse d'hydrogénophosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ à 0,6M) et une solution aqueuse de nitrate de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ à 0,3M). L'un des avantages de cette synthèse est dû aux concentrations utilisées des solutions de sels. Contrairement à la synthèse de l'HA réalisée par voie hydrothermale [Raynaud2002] dans des conditions stœchiométriques (rapport molaire des réactifs $\text{Ca}/\text{P} = 10 / 6 \approx 1,67$), la préparation des ANB est réalisée avec un large excès en ions phosphate (rapport molaire des réactifs $\text{Ca}/\text{P} = 0,5$), ce qui permet de tamponner le milieu de synthèse à un pH (7,2) proche de la valeur physiologique, sans ajout d'ions ou de molécules étrangères. De plus, cette voie de synthèse restreint l'apparition de phases étrangères au cours de la précipitation et limite les phénomènes de dissolution – reprécipitation.

La solution contenant les cations calcium (solution A, Figure 13) est versée manuellement, de façon rapide dans la solution contenant les anions phosphate (solution B, Figure 13). Après avoir agité quelques secondes pour assurer l'homogénéité, le pH de la solution est de 7,2, proche de la valeur du pH physiologique (7,4). Le précipité ainsi formé est vieilli en solution (maturation), à température ambiante, dans des récipients fermés pendant différentes durées déterminées, de 20 minutes à 3 semaines. Au terme de la maturation, le précipité est filtré sur büchner et rincé abondamment à l'eau déionisée, avant d'être séché par lyophilisation.

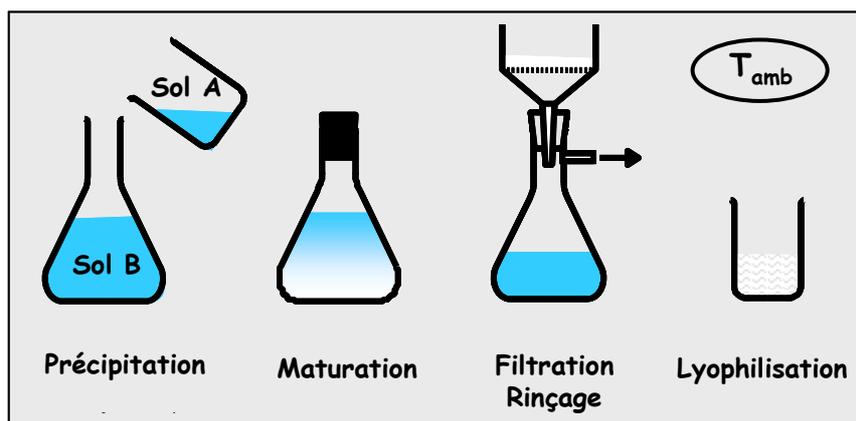


Figure 13. Schéma du déroulement de la synthèse des ANB

L'étape de lavage est très importante car il est nécessaire d'éliminer tous les ions phosphate en excès ainsi que les contre-ions présents dans les solutions de départ.

Le gel recueilli après filtration du précipité étant assez épais, il a été choisi de diviser la filtration sur 4 büchners (≈ 5 g de poudre d'ANB recueillie par büchner) et de laver avec 5L d'eau par büchner afin de favoriser l'élimination des espèces ioniques n'intervenant pas dans la composition de l'apatite ainsi synthétisée. Le mode de séchage par lyophilisation permet ensuite d'éliminer la majorité de l'eau non liée résiduelle tout en limitant les altérations de la couche hydratée présente sur les nanocristaux d'ANB.

Après lyophilisation, les poudres sont conservées au congélateur (-18°C) afin de modérer toute évolution. Un tamisage de la poudre permet de conserver les agglomérats de poudre de taille inférieure à $400\ \mu\text{m}$ ($\approx 80\%$ massique de la poudre synthétisée) qui seront utilisés pour la réalisation des céramiques et les différentes expérimentations.

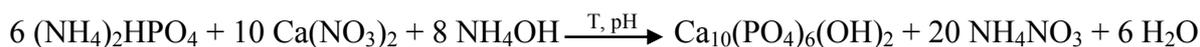
Les ions ammonium et les ions nitrate, respectivement pour les solutions de phosphate et de calcium, ont été choisis en raison de leur interférence négligeable avec le réseau apatitique. Il a été montré que ces ions ne pénètrent que très peu dans le réseau [LeGeros1984].

Comme évoqué dans le chapitre précédent (§ I.1.2.b), la composition chimique du minéral osseux varie en fonction des individus, de leur âge, des apports alimentaires, des facteurs génétiques ou environnementaux, et de l'état de maturation du minéral osseux. Dans le cas des ANB, le temps de maturation des ANB a une incidence directe sur l'étendue de la couche hydratée constituée d'espèces ioniques non-apatitiques labiles qui sont responsables de la grande réactivité de surface et de la capacité des ANB à évoluer [Cazalbou2004a].

Au cours de ce travail, des ANB synthétisées et maturées pendant différentes durées ont été analysées au moyen de différentes techniques de caractérisations physico-chimiques complémentaires afin de suivre l'effet de la maturation sur ces analogues de synthèse du minéral osseux.

II.1.2. La synthèse de l'hydroxyapatite stœchiométrique

L'hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique (HA) est un matériau qui a été utilisé comme référence tout au long de ces travaux. Le laboratoire SPCTS maîtrise depuis longtemps sa méthode de préparation [Raynaud1999]. Comme pour la synthèse des ANB, la synthèse de l'hydroxyapatite stœchiométrique s'effectue par précipitation en voie aqueuse à partir d'une solution de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, pureté : 99 %), et d'une solution d'hydrogénophosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Merck, pureté : 99 %). Mais contrairement à la synthèse des ANB, la précipitation de l'HA se fait en milieu basique, à pH égal à 8,5, et à 90°C suivant l'équation de réaction ci-dessous :



De plus la méthode de synthèse utilisée est de type « inverse » : Elle consiste à ajouter à débit contrôlé la solution de phosphate à la solution de calcium à pH et température réglés.

II.1.2.a. Le montage et le protocole de synthèse

La mise en solution des précurseurs de synthèse dans l'eau distillée se fait sans difficulté. Le schéma du montage de synthèse de l'HA est présenté à la Figure 14.

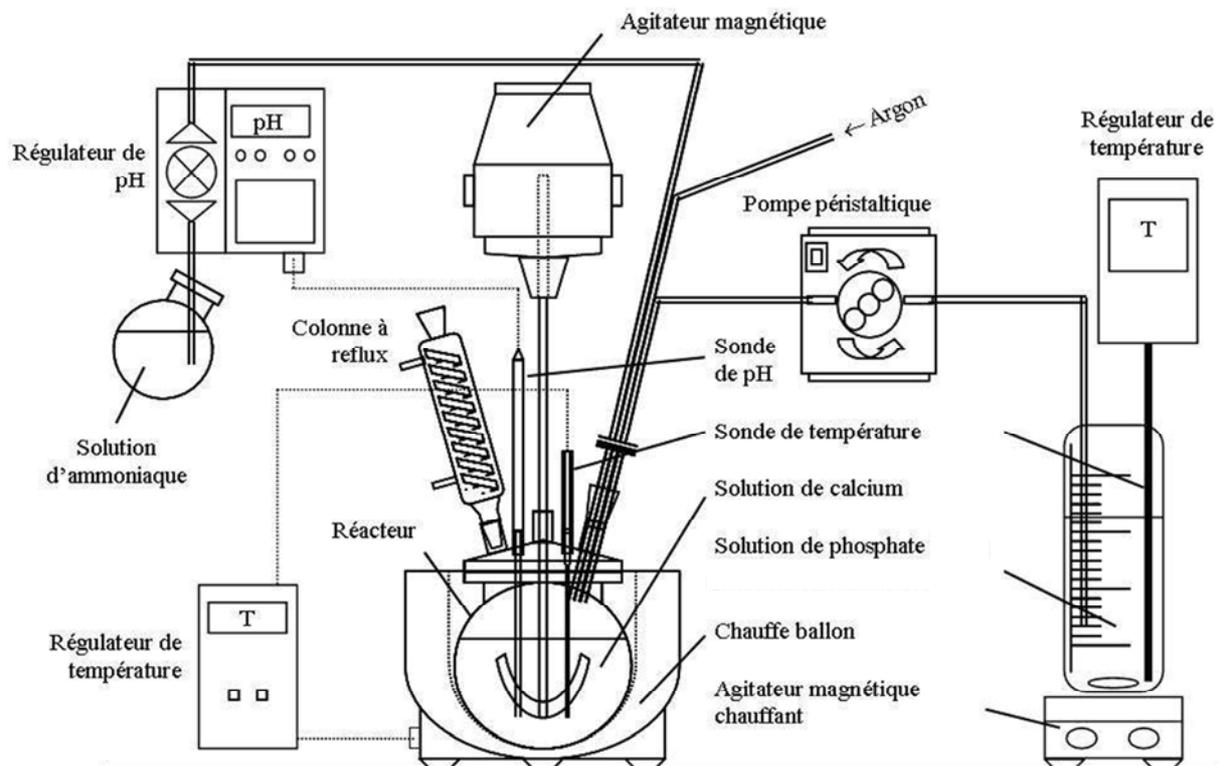


Figure 14. Dispositif de synthèse de l'hydroxyapatite par précipitation

La solution de nitrate de calcium est introduite dans le réacteur, puis chauffée, agitée (RZR 2102 Control, Heidolph) et maintenue à une température de consigne. Le contrôle de la température se fait à l'aide d'une sonde (Horst) plongeant dans la solution. La température est régulée par chauffe-ballon. Une colonne à reflux permet la recondensation des gaz émis durant la synthèse. Le pH du milieu réactionnel doit être maintenu constant à sa valeur de consigne. Il est contrôlé par un régulateur de pH relié à une pompe doseuse (Pompe gamma/L, ProMinent) permettant son ajustement par ajout automatique d'une solution d'ammoniaque NH_4OH à 3 mol.L^{-1} (Merck).

La solution contenant le précurseur de phosphate, placée dans un second réacteur, est également maintenue à une température de consigne *via* une plaque chauffante régulatrice munie d'une sonde de température (IKA Labortechnik). Afin d'éviter une éventuelle carbonatation des produits de synthèse, le réacteur est placé sous balayage d'argon. Lorsque les solutions de calcium et de phosphate ont atteint leur température de consigne, la solution

de phosphate est introduite à débit contrôlé dans le réacteur principal à l'aide d'une pompe péristaltique (Pumpdrive 5206, Heidolph). Après ajout complet, le mélange est maintenu sous agitation mécanique constante et balayage d'argon pendant le temps de maturation. Les régulations en température et en pH sont également maintenues durant cette période. A l'issue de la maturation, le précipité est récupéré par centrifugation (IEC CL40 Centrifuge, Thermo Scientific) à 2500 rpm pendant 5 min. Pour éliminer un maximum de résidus de synthèse, il est ensuite lavé deux fois à l'eau distillée. Le « gâteau » récolté est alors séché dans une étuve ventilée (Mettler) à 80°C pendant 24 h.

II.1.2.b. Les paramètres de synthèse de l'HA

De nombreux paramètres sont à contrôler lors d'une précipitation aqueuse car ce sont eux qui vont conditionner la nature et la qualité de la poudre :

- la température de réaction
- le pH de la réaction
- le temps de maturation
- les concentrations en réactifs
- le rapport molaire Ca/P en solution
- la vitesse d'introduction de la solution de phosphate
- l'atmosphère de la réaction

La concentration des solutions de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ sont identiques et égales à $0,6413 \text{ mol.L}^{-1}$. Les quantités de solution sont ajustées afin de conserver le rapport molaire Ca/P égal à $10/6 = 1,67$ qui correspond au rapport final de l'hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique. Ces conditions sont issues d'un précédent travail effectué au sein du laboratoire SPCTS [Raynaud2002].

La température du milieu réactionnel est régulée à $90,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ tandis que la solution phosphate est maintenue à $75,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Le pH du milieu réactionnel est fixé à $8,5 \pm 0,1$ et la vitesse d'addition du précurseur de phosphate est maintenue à $2,4 \text{ L.h}^{-1}$. Afin d'obtenir des composés monophasés, un temps de maturation de 90 min est appliqué. De plus, un débit d'argon à 30 L.h^{-1} et une vitesse d'agitation du milieu réactionnel à 120 rpm sont imposés tout au long de la synthèse.

PARTIE B.

II.2. La morphologie et la surface spécifique des ANB

II.2.1. La mesure de la surface spécifique

La surface spécifique des poudres est déterminée par la méthode B.E.T. (Brunauer-Emmett-Teller) d'adsorption d'azote à huit points (Analyzer Micromeritics ASAP2010). Par définition, la surface spécifique représente la surface totale par unité de masse du produit. Il s'agit donc de considérer toute la surface de chaque particule, porosité ouverte comprise.

Le cycle d'adsorption-désorption est réalisé grâce à la circulation d'un mélange gazeux He/N₂. Dans un premier temps, l'échantillon est refroidi à l'aide d'azote liquide. L'hélium permet alors de calculer le volume non occupé par l'échantillon dans le tube hermétiquement fermé (volume mort) et l'azote s'adsorbe à la surface de la poudre. Dans un second temps, le bain réfrigérant se retire et le tube est chauffé, ce qui entraîne la désorption du gaz de la surface de la poudre.

L'appareil, en fin de mesure, donne la valeur de la surface mesurée. La surface spécifique (S_{BET}) de l'échantillon est alors calculée selon l'équation suivante :

Surface spécifique (m²/g) = surface mesurée (m²) / masse de l'échantillon introduite pesée (g)

Nous avons vu précédemment, dans l'étude thermogravimétrique (II.3.3) que les pertes d'eau avaient lieu dès le début du chauffage à 30°C. L'eau évaporée à température ambiante est principalement de l'eau physisorbée à la surface des cristaux. Par conséquent elle ne peut être prise en compte dans la structure de l'ANB. Habituellement, une étape de dégazage est

réalisée au-delà de 200°C. Dans le cas des ANB, il y a risque d'altérer l'eau structurant la couche hydratée. Ainsi, avant d'effectuer les mesures comparatives entre les différents échantillons d'ANB avec des temps de maturation variés, le dégazage est réalisé sous vide à 33°C pendant 1 h. Les valeurs de surface sont ensuite obtenues à partir de la mesure de l'isotherme d'adsorption du diazote N₂.

Lorsque le temps de maturation de l'ANB augmente, la surface spécifique de l'ANB diminue (Tableau 7), néanmoins les valeurs restent très élevées. Dans le cas d'une hydroxyapatite, avant frittage, la surface spécifique de la poudre est d'environ 30 m²/g [Palard2007], par conséquent, les S_{BET} des ANB participent également à l'importante réactivité de surface de ces poudres.

Tableau 7. Surface spécifique des poudres d'ANB en fonction du temps de maturation

Temps de maturation	S _{BET} (m ² /g) ± 1
ANB 20 minutes	260
ANB 3 heures	203
ANB 1 jour	212
ANB 3 jours	191
ANB 5 jours	207
ANB 1 semaine	158
ANB 3 semaines	156

II.2.2. Les observations microscopiques

La morphologie des ANB a été étudiée en microscopie électronique à balayage (MEB) à haute résolution avec un canon à émission de champ (« field emission gun » ou FEG, JEOL 7400). La platine cryogénique haute résolution (Gatan Alto 2500), refroidie à l'azote liquide, dont est équipé le MEB-FEG nous a permis d'observer les précipités d'ANB directement dans le milieu de précipitation en cours de maturation. Nous nous sommes intéressés à l'influence de la maturation sur la morphologie, puis nous avons comparé la morphologie des poudres d'ANB mûries et lyophilisées. Les observations microscopiques de poudres ont été réalisées sans le système cryogénique du MEB-FEG.

II.2.2.a. Protocole de préparation des échantillons

Alors qu'en l'absence de la platine cryogénique, l'échantillon (poudre ou massif) est simplement fixé sur le porte échantillon avant d'être introduit dans la chambre d'observation, la platine cryogénique permet d'observer des échantillons hydratés, préalablement congelés. La préparation de l'échantillon hydraté consiste à prélever une goutte à l'aide d'une pipette pasteur et de la déposer sur le porte échantillon. L'échantillon est ensuite congelé et transféré sur un support refroidi à l'azote liquide. A cette température on sait que l'eau contenue dans l'échantillon ne peut pas être sublimée quel que soit le vide dans la chambre du microscope. Avant d'introduire l'échantillon dans la chambre d'observation sous vide, il est nécessaire de fracturer l'échantillon, avant de sublimer la glace de l'échantillon fracturé sur quelques nanomètres pour mettre en relief les structures. La sublimation de la glace est une étape délicate car si elle n'est pas suffisante, ou l'échantillon ne sera pas visible en surface ou il va s'effondrer au moment de l'observation, sous l'effet du faisceau d'électron qui va réchauffer la glace, squelette du précipité dispersé. Si la sublimation est trop importante, l'échantillon aura perdu l'organisation spatiale qu'il possède en milieu liquide.

II.2.2.b. Les observations dans le milieu de précipitation

Pour cette étude, nous avons procédé à un prélèvement directement dans le réacteur de préparation, et ce après divers temps croissants de maturation à 25°C. La Figure 15 reporte les micrographies de l'état du précipité entre 1 minute et 1 semaine de maturation.

Cette figure montre une évolution nette de la morphologie du précipité au cours de la maturation en solution. A notre connaissance, il s'agit des premières analyses cryo-microscopiques effectuées directement sur prélèvements liquides sur de telles apatites biomimétiques.

Après 1 minute de maturation, le précipité semble pouvoir être décrit comme un réseau tridimensionnel de nodules de type sphéroïde présentant un diamètre moyen de l'ordre de 15 nm, ces sphéroïdes tendant à s'organiser en pseudo-filaments ou « chaînes » relativement linéaires. Les nœuds de croisement, en forme de « patte d'oie », correspondent à la rencontre de 3 chaînes.

Il est à ce stade difficile d'identifier avec certitude ces sphéroïdes à un précipité apatitique ou à du phosphate de calcium amorphe. En effet, depuis longtemps, de nombreux auteurs [Terminé1966, Eanes1977] considèrent le phosphate de calcium amorphe comme un précurseur de l'apatite. C'est pourquoi nous avons synthétisé, par précipitation selon la méthode de Heughebaert, du phosphate tricalcique amorphe ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, ou TCP_{am}) [Heughebaert1977] que nous avons ensuite observé au MEB-FEG afin de comparer sa morphologie avec les nodules précédemment observés. Bien que le grossissement soit peu élevé, l'observation de la poudre lyophilisée de TCP_{am} montre des nodules de tailles variées (Figure 16).

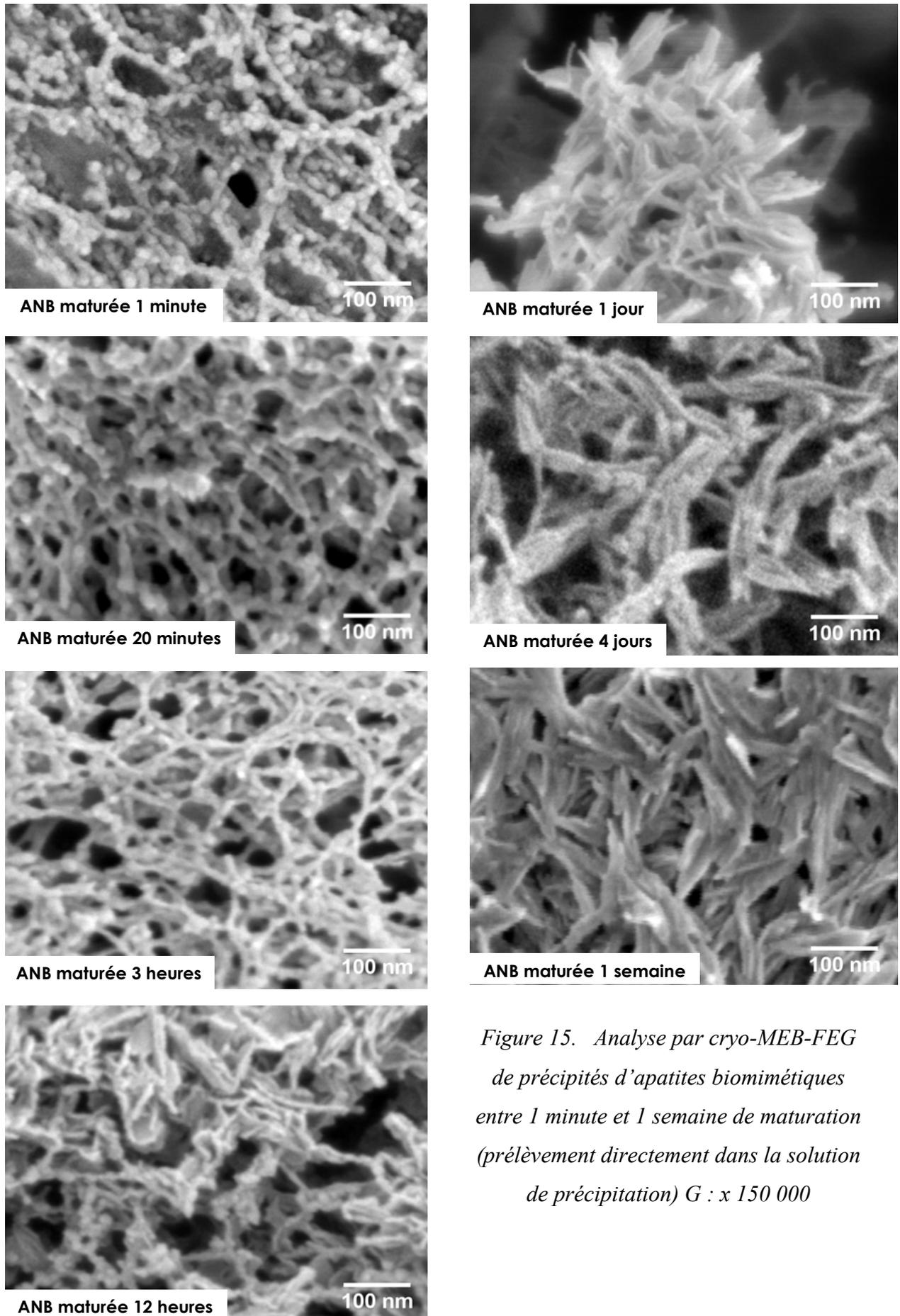


Figure 15. Analyse par cryo-MEB-FEG de précipités d'apatites biomimétiques entre 1 minute et 1 semaine de maturation (prélèvement directement dans la solution de précipitation) $G : \times 150\,000$

Une majorité des nodules du TCP_{am} semble avoir un diamètre de l'ordre de 20 nm (> Ø des sphéroïdes dans le précipité d'ANB mûré 1 et 20 minutes). L'organisation linéaire des nodules dans les précipités mûrés 1 et 20 min nous incite à éliminer l'hypothèse que l'eau prélevée avec le précipité et non sublimée soit à l'origine d'artefacts en forme de sphéroïdes. De plus, ces nodules disparaissent progressivement avec le vieillissement du précipité. Ils sont absents après t = 12 h. A t = 3 h, les sphéroïdes initiaux sont moins nombreux. Des filaments de diamètre moyen 10 nm semblent prendre leur place. Les nodules et/ou filaments sont organisés selon le réseau tridimensionnel initial. La distance entre 2 nœuds est inchangée (≈ 70 nm). Le diamètre des filaments, inférieur à celui des nodules, laisse penser à un réarrangement par réaction de dissolution / reprécipitation. A t = 12 h, les sphéroïdes ont laissé place quasi-totalement à un réseau tridimensionnel de particules allongées en forme d'aiguilles, avec une longueur moyenne de 70-80 nm et un diamètre moyen proche de 10 nm, soit légèrement inférieur au diamètre moyen des sphéroïdes initiaux. A t = 1 jour, le « réseau 3D » a disparu, des aiguilles indépendantes, de longueur 70-80 nm s'entrecroisent. Il est possible que les nœuds du réseau se soient rompus car la nouvelle longueur des aiguilles correspond à la distance qui séparait deux nœuds. A t = 4 jours, puis 1 semaine, les aiguilles précédentes sont clairement identifiables, elles présentent une longueur moyenne d'environ 100 nm et une largeur d'environ 7-8 nm, et semblent s'organiser en fagots. Par ailleurs, nos observations tendent à montrer que ces fagots d'aiguilles semblent eux-mêmes être appariés pour former des associations de fagots entre lesquels une zone d'interaction de type « gangue » semble présente.

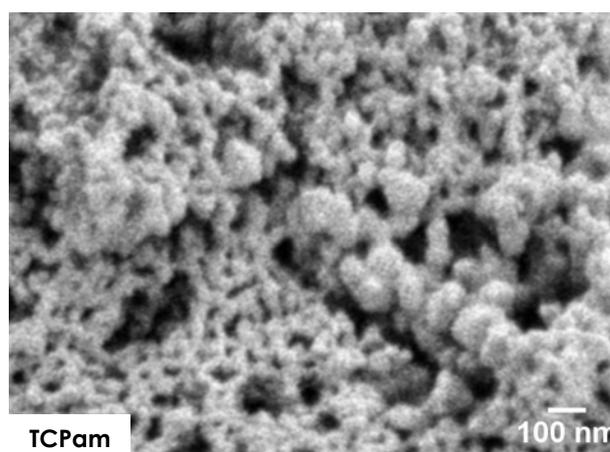


Figure 16. Observation MEB-FEG de la poudre de phosphate tricalcique amorphe ($Ca_3(PO_4)_2$, ou TCP_{am}), G : x 60 000

La Figure 17 donne une représentation schématique de l'évolution du précipité. La taille moyenne des sphéroïdes (visualisables sur les étapes 1 et 2) est du même ordre de grandeur que la taille moyenne des cristallites estimées à partir des données de DRX (Tableau 10) suggérant probablement une identification des sphéroïdes à des cristallites individualisées. En revanche, pour des temps de maturation plus longs, les aiguilles observées (étapes 3 et 4) présentent une longueur moyenne proche de 100 nm, et cette dimension apparaît alors notablement supérieure à celles des cristallites individuelles. On peut alors présumer la formation de particules polycristallines faisant intervenir des cristallites en forte interaction (agglomération).

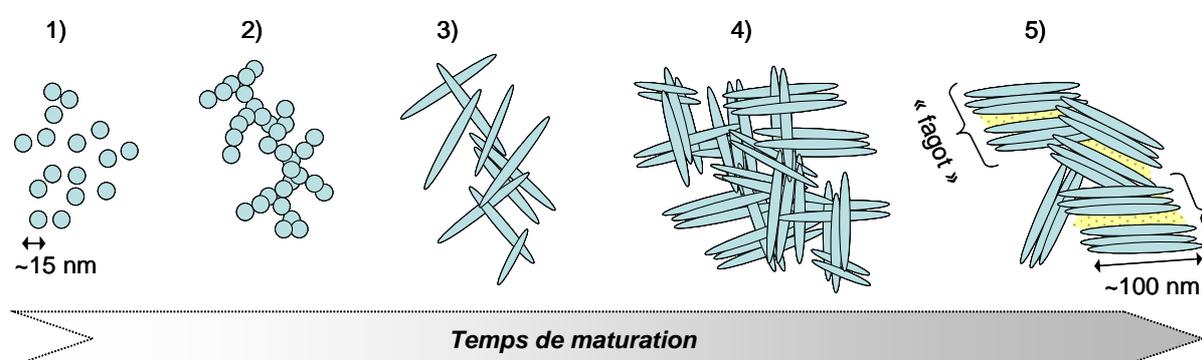


Figure 17. Représentation schématique de nos observations en cryo-microscopie pendant la maturation (à 25°C) d'apatites biomimétiques

Nous avons étudié l'effet de la dilution du milieu de précipitation sur l'aspect général du précipité. Les mêmes conclusions morphologiques ont été tirées. En particulier, la présence de fagots d'aiguilles en interaction (étape 5) est toujours observée, formant alors des îlots plus dispersés dans l'eau.

II.2.2.c. Les observations des ANB après lyophilisation

La Figure 18 montre la morphologie des ANB après lyophilisation du précipité. La lyophilisation stoppe le processus de maturation dans le milieu réactionnel. Les mêmes caractéristiques morphologiques que dans le milieu réactionnel sont observées. Cela tend à indiquer qu'il s'agit bien de l'état réel du système apatitique en présence.

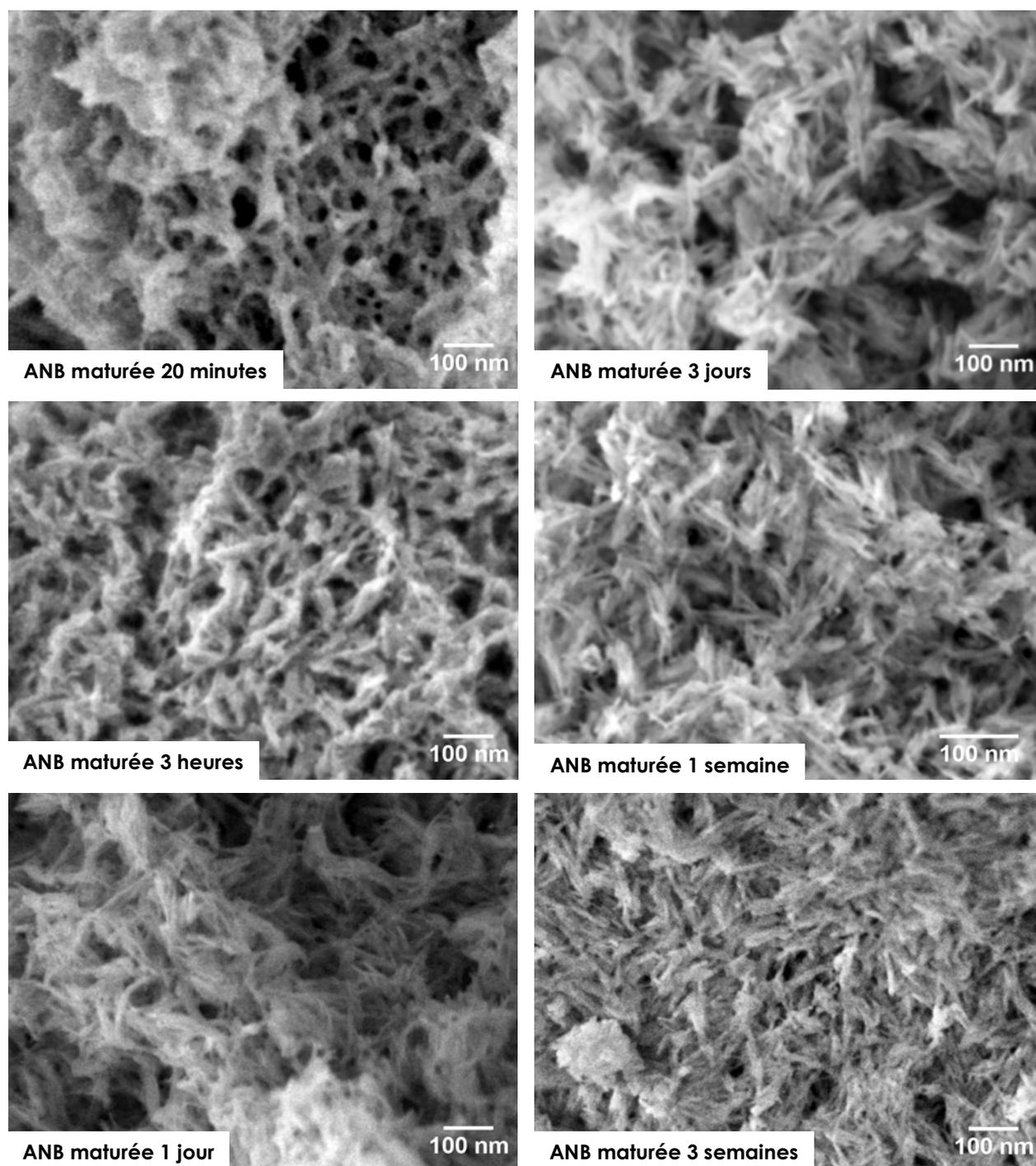


Figure 18. Analyse par MEB-FEG de poudre d'apatites biomimétiques lyophilisées, entre 20 minutes et 3 semaines de maturation $G : \times 100\,000$

II.3. La caractérisation des poudres

II.3.1. La diffraction des rayons X appliquée aux poudres synthétisées

Les poudres d'ANB préparées avec différents temps de maturation ont été étudiées par diffraction des rayons X (DRX). Dans ce cas, la poudre est considérée comme un composé avec un grand nombre de cristallites orientées de façon aléatoire les unes par rapport aux autres. Les cristallites de la famille de plan (hkl) répondant à la condition de Bragg vont diffracter.

Les diffractogrammes sur poudres sont acquis avec la radiation $K\alpha$ du cuivre. Les phases en présence sont identifiées par comparaison avec les références du fichier *International Center for Diffraction Data – Powder Diffraction Files* (ICDD-PDF) sur le logiciel EVA (Brüker AXS).

★ **Analyse DRX sur la poudre brute d'hydroxyapatite stœchiométrique**

Les diffractogrammes de la poudre d'HA, avant et après calcination, sont acquis dans l'intervalle $[29^\circ - 64^\circ]$. Les conditions d'acquisition des diffractogrammes sont indiquées dans le Tableau 8.

Tableau 8. Appareillages et conditions d'acquisition des diffractogrammes, obtenus pour la poudre d'HA synthétisée sur le réacteur, avant et après calcination

Conditions	poudre brute	poudre calcinée pendant 15h à 1000°C
diffractomètre $\theta/2\theta$	Siemens D5000	Brüker D8 Advance équipé d'un monochromateur avant
$CuK\alpha_1/K\alpha_2$	1,54056 Å / 1,54439 Å	1,5406 Å
pas	0,05°	0,021°
temps de comptage	4s	2s

La Figure 19A présente le diffractogramme de la poudre brute d'hydroxyapatite stœchiométrique synthétisée dans le réacteur. Tous les pics ont été identifiés comme appartenant à la structure cristalline de l'hydroxyapatite (fiche ICDD-PDF n° 09-0432). Les

pics de diffraction possèdent des largeurs à mi-hauteur (*Full Width at Half Maximum* ou FWHM) larges et sont mal définis, ce qui correspond à un faible état de cristallinité. De plus selon les directions des plans cristallographiques (perpendiculaire ou parallèle à l'axe « c » de la structure apatitique), les FWHM ne sont pas identiques. Ce phénomène peut être lié à la croissance préférentielle des cristallites selon un axe (anisotropie des grains).

La poudre d'hydroxyapatite brute, en sortie du réacteur, est constituée d'une apatite monophasée mal cristallisée.

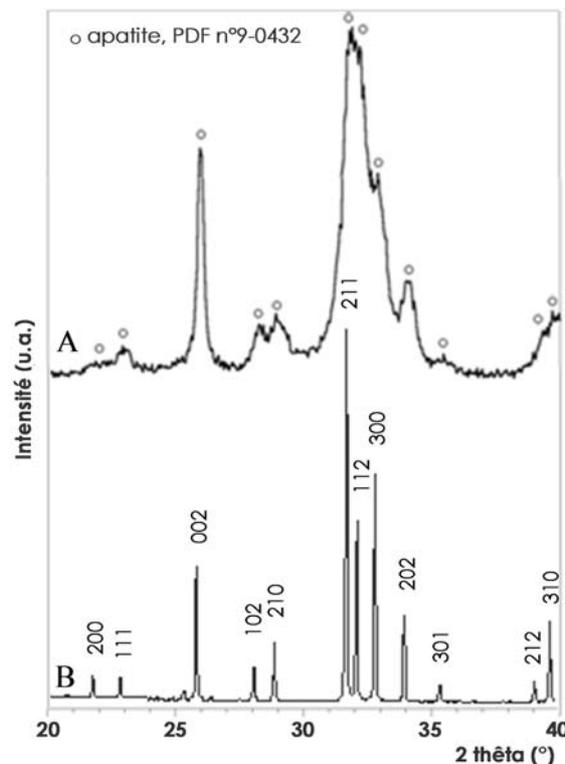


Figure 19. Diagramme DRX de la poudre d'HA brute issue de la synthèse sur le réacteur (A) et cristallisée après calcination pendant 15h à 1000°C (B)

Afin de vérifier la pureté du précipité, il est nécessaire d'effectuer des analyses complémentaires. Une calcination à 1000°C pendant 15h permet d'améliorer l'état de cristallinité de la phase apatitique. Ce traitement est préconisé par la norme AFNOR ISO 13779-3 [AFNOR2008] afin d'identifier les phases cristallines présentes dans les matériaux dont le rapport molaire Ca/P est compris entre 1,500 et 1,667 [AFNOR2008]. La Figure 19B montre le diffractogramme du produit de synthèse de l'hydroxyapatite préparée dans les conditions stœchiométriques, après calcination. Tous les pics sans exception peuvent être indexés avec la fiche PDF 09-0432 de l'hydroxyapatite. Il s'agit d'un composé monophasé.

Les pics fins et très bien définis correspondent à l'hydroxyapatite pure très bien cristallisée. Cette hydroxyapatite sera utilisée comme matériau de référence pour la suite des travaux.

★ **Analyse des précipités d'apatite nanocristalline biomimétique (ANB) après maturation**

Les acquisitions des diffractogrammes ont été réalisées à plus haute résolution afin d'amplifier le signal et de minimiser le bruit de fond. L'appareillage utilisé est un diffractomètre Brüker D8 Advance (Cu $K\alpha_1$ 1,5406 Å), équipé d'un monochromateur. Les paramètres d'acquisition sont mentionnés dans le Tableau 9.

Tableau 9. Conditions expérimentales pour l'acquisition des diffractogrammes RX des poudres d'ANB

Plage angulaire 2θ (°)	Pas en 2θ (°)	temps de pause (s)
20,00 – 3,98	0,021	2
36,99 – 66,97	0,021	2,7
66,99 – 90,00	0,021	5

Tous les précipités obtenus fournissent des diffractogrammes similaires (Figure 20). Quel que soit le temps de maturation du précipité dans la solution, toutes les raies sont identifiées sur la fiche PDF 09-0432 correspondant à l'hydroxyapatite. Les profils montrent cependant des raies larges et mal résolues. Les profils de diffraction obtenus sont caractéristiques des profils de diffraction collectés à partir d'apatites biologiques telles que la partie minérale de l'os [Eichert2007]. La diffraction des rayons X indique que les précipités d'ANB obtenus sont constitués d'apatite faiblement cristallisée (comme le minéral osseux) et exempte de phase cristalline étrangère détectable.

En plus de la détermination de la pureté du composé, le profil des raies de diffraction des rayons X permet également d'obtenir des informations sur la structure et la microstructure du matériau :

- informations structurales : paramètres de maille, groupe d'espace
- informations microstructurales : taille de grains, contraintes, texture

En effet, sur le profil de diffraction, la variation de l'intensité diffractée est fonction de l'angle de Bragg (θ), ainsi chaque raie donne accès à 3 informations distinctes :

→ l'intensité intégrée, combinée à la position des raies, est utilisée pour l'identification des phases cristallines. L'intensité intégrée est liée à la position des atomes dans la maille (via le facteur de structure F_{hkl}), à l'angle de diffraction θ et à la quantité de cristallites pouvant diffracter, c'est-à-dire de domaines cohérents de diffraction. Les cristallites qui diffractent sont elles-même fonction de l'orientation préférentielle des grains (ou texturation).

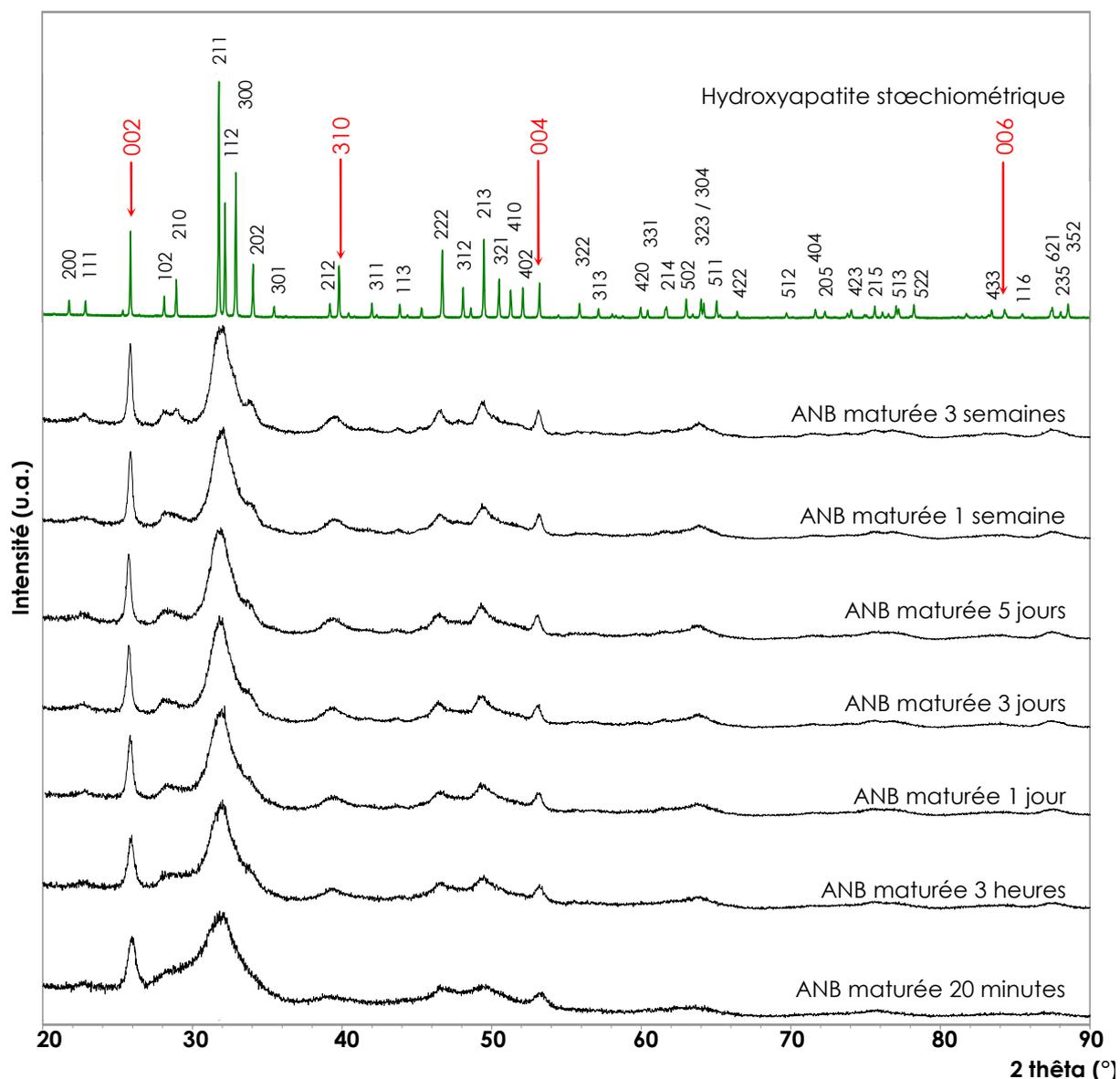


Figure 20. Diffractogrammes d'apatites ANB en fonction de la maturation

Dans le cas des apatites faiblement cristallisées, la FWHM importante des raies crée de nombreuses juxtapositions de raies. Ainsi, les raies très larges observées sont multiples, c'est-à-dire qu'elles correspondent à plusieurs contributions, ce qui rend la détermination de l'intensité de chaque raie peu exploitable et l'interprétation des résultats particulièrement imprécise.

→ la position donne des informations structurales sur le groupe d'espace (SG) et les paramètres cristallographiques de maille ($a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$) ;

Les apatites, et notamment l'hydroxyapatite, ont une structure cristalline hexagonale (§ I.1.4.e). Etant donné les profils de raies obtenus pour les apatites faiblement cristallisées synthétisées, nous pouvons considérer que leur structure cristallographique est également hexagonale avec le groupe spatial $P6_3/m$ [Elliot1994].

→ la largeur à mi-hauteur des pics (*Full Width at Half Maximum* ou FWHM) est liée à l'instrumentation, et est sensible à la périodicité du réseau cristallin. Elle dépend de l'inverse de la taille des cristallites, et de l'existence de micro-contraintes (présence de lacunes et décalage des atomes par rapport à la position apatitique, générant des distorsions dans la périodicité). Dans le cas de particules nanométriques, la FWHM est majoritairement reliée à la contribution de la taille des cristallites.

Une estimation de la dimension moyenne des cristallites peut alors être déterminée en première approximation, à partir de la largeur à mi-hauteur des raies. La raie (002) et la raie (310) (partiellement superposée à la raie (212) de plus faible intensité), sont généralement exploitées (Figure 20). Elles renseignent respectivement sur la dimension des cristallites le long de l'axe « c » de la maille hexagonale (raie (002)) et dans une direction perpendiculaire à celui-ci (raie (310)). Les diffractogrammes ont été ajustés en mode *pattern matching*, (c'est-à-dire en tenant compte sur diffractogramme complet, mais sans préciser la position des atomes) à l'aide du logiciel JANA2006.

Des informations telles que les paramètres de maille (a et c), la position des raies et leur largeur à mi-hauteur ont alors pu être ajustées.

- Estimation des dimensions des cristallites, selon le modèle de Scherrer

En supposant que les micro-contraintes sont négligeables, la formule de Scherrer (Equation (1)) [Scherrer1918] permet d'estimer la dimension des domaines cristallisés dans une direction perpendiculaire au plan de diffraction (hkl) donné :

$$\text{Equation (1)} \quad \beta^* = \frac{K \cdot \lambda}{L_{hkl} \cdot \cos(\theta_{hkl})} = \sqrt{\beta^2 - \beta_0^2}$$

avec :

L_{hkl} : taille apparente dans la direction perpendiculaire au plan de diffraction (hkl) (Å)

K : constante de Scherrer - K = 0,94 (considérant, en première approximation, la poudre formée de grains sphériques avec une orientation aléatoire)

λ : longueur d'onde du rayonnement X ($\lambda_{CuK\alpha 1} = 1,5406 \text{ \AA}$)

θ_{hkl} : angle de diffraction correspondant à la raie (hkl) considérée (°)

β^* : largeur à mi-hauteur corrigée de la raie (hkl) (rad)

β : largeur à mi-hauteur mesurée de la raie (hkl) (rad)

β_0 : largeur à mi-hauteur (FWHM) mesurée de la raie (hkl) d'une hydroxyapatite bien cristallisée (rad) et constitué de cristaux de taille nanométrique

De façon générale, les différents travaux sur les apatites nanocristallines biomimétiques montrent que les nanocristaux en forme d'aiguille ont une longueur et un diamètre moyens compris respectivement entre 200 - 400 Å et entre 20 - 80 Å [Eichert2007]. D'autre part, Eichert s'est intéressée aux dimensions des nanocristaux appartenant à différents spécimens de minéral osseux (Tableau 10) [Eichert2001].

Les valeurs obtenues dans le Tableau 10, et illustrées sur la Figure 21B confirment le caractère nanocristallin des ANB synthétisées, ainsi que la forme allongée des cristallites. Avec l'augmentation du temps de maturation, les valeurs calculées à partir de la formule de Scherrer, témoignent d'une augmentation de la longueur et de l'épaisseur des cristallites des

ANB synthétisées. La croissance est très rapide le premier jour et ralentit ensuite selon une fonction sensiblement logarithmique.

Tableau 10. Dimensions apparentes des cristallites des ANB en fonction du temps de maturation et pour quelques apatites biologiques

	L(002) $\sigma = 4 \text{ \AA}$	L(310) $\sigma = 1 \text{ \AA}$
ANB maturée 20 minutes	143	19
ANB maturée 3 heures	165	31
ANB maturée 1 jour	211	35
ANB maturée 3 jours	237	43
ANB maturée 5 jours	260	44
ANB maturée 1 semaine	267	46
ANB maturée 3 semaines	319	58
os de poulet [Eichert2001]	207	66
os de lapin [Eichert2001]	190	Non Evaluée
os humain d'un adulte [Eichert2001]	213	72

La Figure 20 montre très bien que même après 3 semaines de maturation, les raies des RX restent très larges. Néanmoins, avec l'augmentation du temps de maturation, la définition des raies s'améliore (Figure 21A) : la diminution des FWHM des raies suggère une amélioration de la cristallinité et/ou une augmentation de la taille moyenne des domaines cohérents et/ou une diminution des microcontraintes.

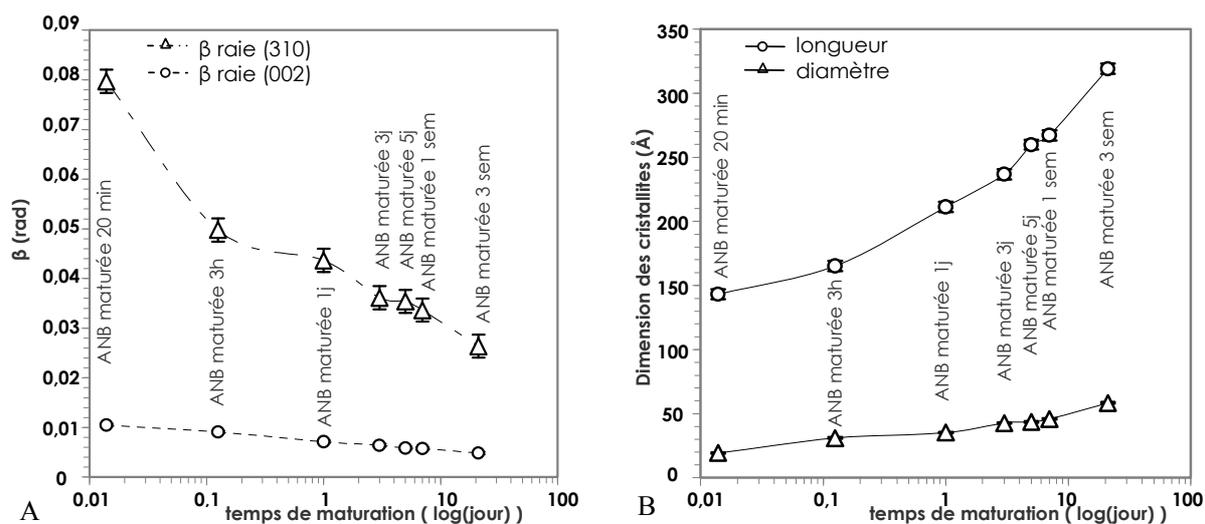


Figure 21. Evolution, selon la formule de Scherrer, de la FWHM des raies (310) et (002) (A) et de la taille des cristallites (B)

Nous considérons que la largeur des raies de l'HA stœchiométrique cristallisée (calcination à 1000°C – 15 h) est liée à l'incertitude de l'appareillage. Ainsi, pour écarter les erreurs liées à cette incertitude, chaque largeur de raie de l'HA a été soustraite à la largeur de raie correspondante de l'ANB. Toutefois cette appréciation de la taille des cristallites considère que la largeur des raies de diffraction est uniquement liée à la taille des cristallites. En réalité, comme indiqué précédemment, l'existence de micro-contraintes a une influence sur la FWHM qui peut s'avérer non négligeable sur la FWHM.

- Evaluation de la taille et du désordre des cristallites selon le modèle de Hosemann et Vogel

Il apparaît intéressant de suivre l'évolution du désordre cristallin au cours de la maturation des apatites faiblement cristallisées.

Afin de déterminer l'amplitude des imperfections du réseau cristallin, le modèle de Hosemann et Vogel [Hosemann1962, Vogel1970] a été utilisé. Etant donné le phénomène d'anisotropie des apatites nanocristallines, nous devons considérer une même famille de plans. Comme il n'est pas possible d'utiliser la famille (310), (620), (930) car la plage angulaire est trop grande et que les raies sont de moins en moins bien définies pour les 2θ élevés, nous nous sommes intéressés à la famille de plans (00 l) : (002) à $2\theta \approx 25,88^\circ$, (004) à $2\theta \approx 53,22^\circ$, (006) à $2\theta \approx 84,43^\circ$.

La relation entre la largeur des raies de diffraction et le paramètre de désordre cristallin, respectivement nommés β^* et g , est donnée, conformément aux travaux de Vogel et Hosemann, par l'Equation (2):

$$\text{Equation (2)} \quad \beta^* = \frac{1}{L_{hkl}} + \pi^2 \frac{g_{hkl}^2}{d_{hkl}} \quad m^2 = \sqrt{\beta^2 - \beta_o^2}$$

avec :

β^* : largeur à mi-hauteur corrigée de la raie (hkl) (rad)

β : largeur à mi-hauteur mesurée de la raie (hkl) (rad)

β_o : largeur à mi-hauteur (FWHM) mesurée de la raie (hkl) d'une hydroxyapatite bien cristallisée (rad)

d_{hkl} : distance interréticulaire pour une famille de plan (hkl) dans une direction cristallographique donnée

g_{hkl} : paramètre de distorsion dans la même direction cristallographique

L_{hkl} : taille apparente dans la direction perpendiculaire au plan de diffraction (hkl) (Å)

m : ordre de réflexion, $m^2 = (h^2 + k^2 + l^2)$

Selon la formule de Hosemann et Vogel, la largeur à mi-hauteur corrigée (β^*) s'exprime selon deux termes : un lié à la taille des cristallites, et l'autre lié au désordre cristallin. L'évolution de β^* en fonction de m^2 (Equation (2)) peut être représentée par une droite de la forme « $\beta^* = a.m^2 + b$ ».

La Figure 22 montre deux exemples de régression linéaire $\beta^* = f(m^2)$ obtenues pour la famille de plan (00 l). Les coefficients de corrélation sont égaux à 0,9976 et 0,9990, pour les ANB respectivement maturées 20 minutes et 1 semaine.

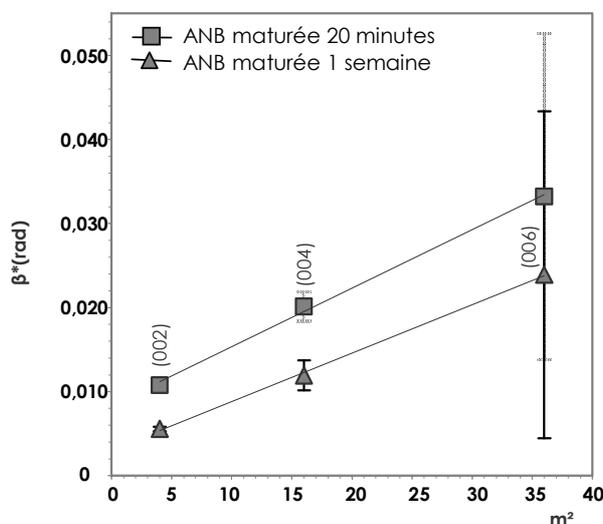


Figure 22. Droites $\beta^* = f(m^2)$ correspondants aux plans (00 l), pour 2 exemples d'ANB maturées (20 minutes et 1 semaine)

Alors que la pente de la droite d'équation $\beta^* = a.m^2 + b$ est fonction du paramètre g de distorsion, l'ordonnée à l'origine est inversement proportionnelle à la taille des cristallites. La contribution de chacun des deux termes à la valeur de β^* est reportée dans le Tableau 11. Les

valeurs indiquent que le phénomène de désordre cristallin n'est pas négligeable, même aux faibles angles où le terme « a » représente une vingtaine de pourcent de la valeur de β^* .

Etant donné la faible résolution des diffractogrammes due à la faible cristallinité des ANB et à la taille nanométrique des cristallites, il est possible d'affirmer que les contributions des termes « a » et « b », pour une raie donnée, sont du même ordre de grandeur pour toutes les ANB. De plus, quel que soit le temps de maturation de l'ANB, la contribution du terme « a » lié au désordre est environ 2 fois et 3 fois plus importante respectivement pour les raies (004) et (006) que pour la raie (002). Inversement, la contribution du terme « b » lié à la taille des cristallites est divisée par 2 et par 3 respectivement pour les raies (004) et (006).

Tableau 11. Equation de droite $\beta^* = f(m^2)$ sous la forme $\beta^* = a.m^2 + b$ pour chaque ANB maturée : contribution des termes a et b à la valeur de β^*

temps de maturation	$a = \pi^2 \frac{g_{hkl}^2}{d_{hkl}}$			$b = \frac{1}{L_{hkl}}$		
	Contribution à β^*			Contribution à β^*		
	raie (002)	raie (004)	raie (006)	raie (002)	raie (004)	raie (006)
20 minutes	22 %	59 %	75 %	78 %	42 %	25 %
3 heures	29 %	52 %	74 %	71 %	48 %	26 %
1 jour	18 %	45 %	79 %	83 %	55 %	21 %
3 jours	36 %	65 %	82 %	64 %	35 %	18 %
5 jours	13 %	54 %	69 %	87 %	46 %	31 %
1 semaine	38 %	71 %	86 %	62 %	29 %	14 %
3 semaines	18 %	59 %	67 %	82 %	41 %	33 %

Quel que soit le modèle utilisé, la longueur des cristallites augmente (Figure 23B) et le désordre cristallin diminue (Figure 23A) avec le temps de maturation. Notons que la dispersion des points obtenus avec la formule de Hoseman et Vogel (Figure 23B) ne tient pas compte de l'orientation préférentielle possible.

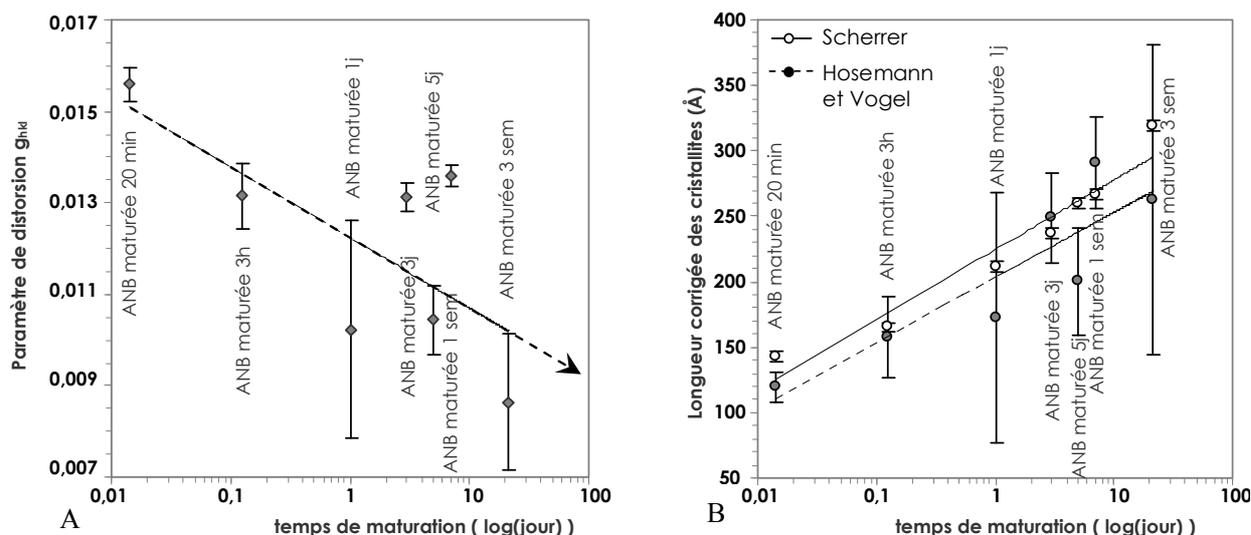


Figure 23. Variation du paramètre de distorsion g_{hkl} calculé à partir du modèle de Hosemann et Vogel (A) et évolution de la longueur des cristallites selon les deux modèles (B) en fonction du temps de maturation

En effet les cristallites sont mieux ordonnées après des temps longs de maturation ; les espèces ioniques occupant progressivement des sites cristallographiques apatitiques. Globalement, comme nous le verrons ultérieurement (§ II.3.2), en vieillissant en solution, les cristallites d'ANB tendent vers la stœchiométrie (sans l'atteindre), donc vers un état plus ordonné.

- Evaluation des paramètres de maille

Comme nous l'avons précédemment vu dans le § I.1.5, dans la structure apatite les ions OH^- jouissent d'une grande mobilité et peuvent donc être facilement substitués. Des substitutions sont également possibles en sites Ca^{2+} ainsi qu'en sites PO_4^{3-} . Afin de maintenir l'électroneutralité au sein de la maille, les échanges ioniques peuvent mettre en jeu des espèces de valences différentes et entraînent la création de lacunes sur les sites Ca^{2+} et/ou sur les sites OH^- . Dans la littérature, les apatites substituées voient leurs paramètres de maille varier en fonction des ions de substitution et du taux de substitution. De nombreuses substitutions ioniques peuvent être recensées. A l'échelle atomique, que ce soit par la création de lacunes et/ou pour des raisons d'encombrement stérique, les substitutions ioniques modifient les paramètres de maille de la structure.

Par exemple, l'introduction de silicium dans la maille apatitique, en substitution au phosphore, entraîne la variation des paramètres de la maille hexagonale apatitique. Cependant, tous les résultats sur ce point ne concordent pas. Le paramètre de maille « c » augmente dans la majorité des cas avec le taux de silicium, il peut également rester constant [Palard2007] alors que le paramètre de maille « a » peut croître [Balas2003, Kim2003, Arcos2004, Palard2007] ou décroître [Gibson1999, Tang2005]. Si « a » décroît, le volume de maille ne varie quasiment pas alors que lorsque « a » augmente, la maille se dilate. Malgré le même mode de synthèse, les résultats diffèrent de manière significative selon les études.

Dans les hydroxyapatites calcocadmées [Nounah1992, Marchat2005], ainsi que dans les apatites calco-magnésiennes hydroxylées [Abdelkader2001], la substitution des ions calcium, respectivement par des ions cadmium et magnésium, se traduit par une diminution des paramètres de maille « a » et « c ».

Dans ses travaux, Bonel montre qu'en fonction du taux de carbonatation des sites A (site OH), le paramètre « a » augmente de façon importante avec une diminution significative de « c » [Bonel1972]. Les travaux de Labarthe se rapportent à la carbonatation de type B (site PO₄) et mettent en évidence l'importante diminution du paramètre de maille « a » en fonction du taux de carbonatation de l'apatite [Labarthe1973]. La carbonatation de type B n'entraîne aucune variation du paramètre de maille « c ».

Dans le cadre de ce travail, rappelons que les sites M sont occupés par des ions Ca²⁺ ou laissés vacants. Les sites Z sont partiellement hydroxylés, tandis que les ions PO₄³⁻ et HPO₄²⁻ se partagent l'occupation des sites XO₄. La Figure 24 donne un aperçu des évolutions globales des paramètres de maille « a » et « c » (A) et du volume de la maille (B), que nous avons observées dans les ANB en fonction du temps de maturation. Rappelons néanmoins qu'en plus des incertitudes liées à la préparation de l'échantillon lors de l'acquisition et aux calculs, ces diffractogrammes ont été recueillis à partir d'ANB faiblement cristallisées (les raies sont mal définies) avec une structure complexe : un cœur de structure apatitique, et une couche phosphocalcique hydratée structurée mais non-apatitique. Par conséquent, les résultats d'affinement peuvent comporter une grande incertitude et doivent être considérés avec précaution.

Le paramètre « c » a tendance à augmenter, tandis que le paramètre « a » semble légèrement diminuer. Les évolutions du volume de maille sont similaires à celles du paramètre « a ».

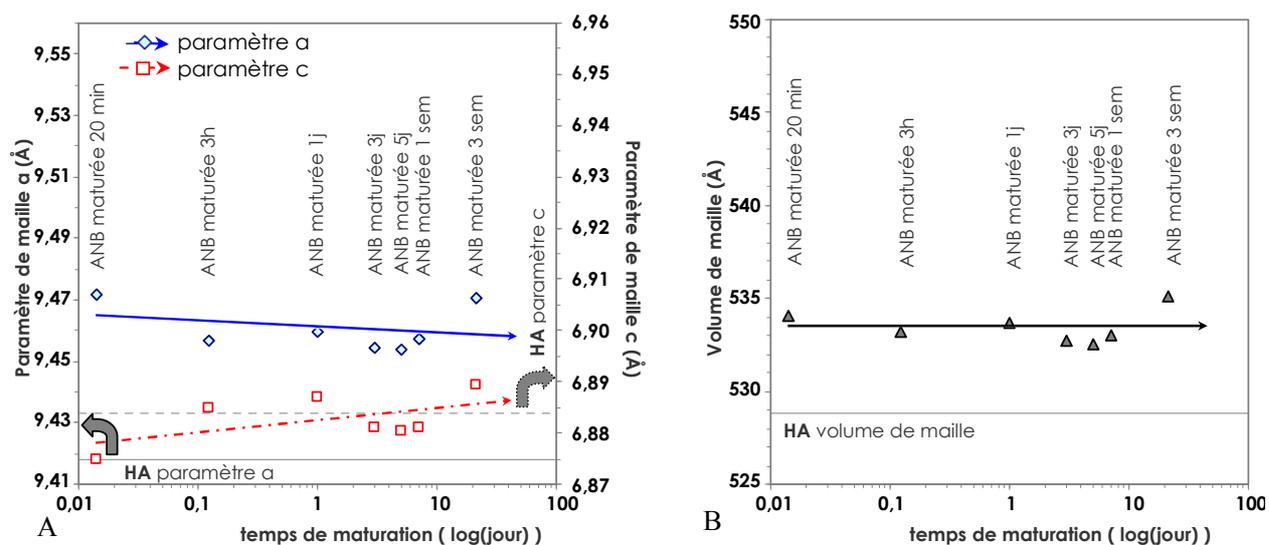


Figure 24. Paramètres de maille a et c (A) et volume de maille des ANB (B) en fonction du temps de maturation, comparés aux données de l'HA stœchiométrique selon la fiche ICDD-PDF 09-0432

★ Caractérisation des poudres calcinées

La calcination à 1000°C pendant 15h est un traitement thermique recommandé selon la norme internationale ISO 13779-3 : 2008 [AFNOR2008] afin de déterminer la pureté de la phase d'hydroxyapatite. Il a été vu dans le § I.1.5.a que dans le cas des apatites phosphocalciques dont la composition présente un écart à la stœchiométrie, le traitement thermique à 1000°C peut conduire à un matériau biphasique. Les phases cristallines en présence dépendent du rapport molaire Ca/P de l'apatite initiale. Les apatites possédant un rapport molaire compris entre 1 et 1,67 conduiront, après traitement thermique à 1000°C, à un matériau cristallin monophasique dans les cas où Ca/P est égal à 1 (le pyrophosphate de calcium β , ou β -CPP), 1,5 (le phosphate tricalcique β , ou β -TCP) ou 1,67 (l'hydroxyapatite, ou HA), ou biphasique pour les Ca/P intermédiaires. Le Tableau 12 regroupe les phases cristallines rencontrées après calcination, leur rapport molaire Ca/P, et les numéros des fiches PDF correspondantes.

Tableau 12. Fiches PDF de référence pour l'indexation des différents composés

Formule chimique	Nom du composé	Ca/P molaire	N° de fiche ICDD-PDF
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hydroxyapatite (HA)	1,67	00-09-0432
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Phosphate tricalcique β (β -TCP)	1,5	00-09-0169
$\text{Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$	Pyrophosphate de calcium β (β -CPP)	1	00-09-0346

Dans le cas des poudres d'ANB mûries, la calcination à 1000°C a conduit à des matériaux biphasiques avec une phase majoritaire de β -TCP (fiche PDF 09-0169) (Figure 25) quel que soit le temps de maturation du précipité entre 20 minutes et 3 semaines. La raie principale du diffractogramme correspond à la raie principale (0210) d'intensité relative 100 % du β -TCP (Tableau 13), à $2\theta = 31,2^\circ$ encadrée en bleu sur la Figure 25.

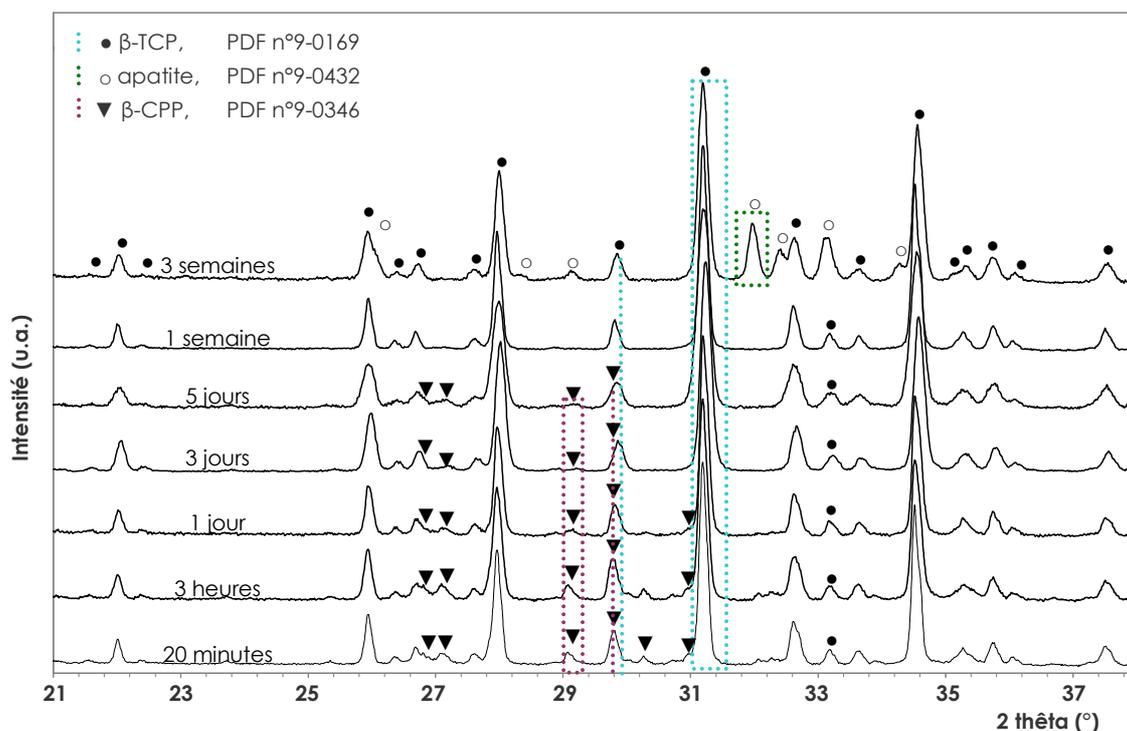


Figure 25. Diffractogrammes d'ANB à différents temps de maturation, après calcination pendant 15h à 1000°C [AFNOR2008]

Pour les temps de maturation inférieurs à 1 semaine, des pics supplémentaires ont été identifiés correspondant à la fiche PDF n°09-0346 : la phase cristalline secondaire est le β -CPP. La raie (008) d'intensité relative $I/I_0 = 100\%$ du β -CPP (à $2\theta = 29,8^\circ$ mise en évidence par la droite violette sur la Figure 25) apparaît comme un épaulement au niveau de la raie (300) d'intensité relative 16 % du β -TCP (à $2\theta = 29,85^\circ$ mise en évidence par la droite bleue sur la Figure 25). Les raies (200), (201), (203) isolées (à $2\theta = 29,1^\circ$ dans l'encadrement violet sur la Figure 25), (211) et (212) de la phase β -CPP sont distinctes. Leur position et intensité relative I/I_0 sont indiquées dans le Tableau 13.

Pour l'ANB mûrie pendant 1 semaine, seul le β -TCP est identifié.

Pour l'ANB maturée pendant 3 semaines, la comparaison avec la fiche PDF 09-0432 (hydroxyapatite) a mis en évidence la présence d'hydroxyapatite au côté du β -TCP. La raie principale (211) de l'HA, à $2\theta = 31,9^\circ$, est encadrée en vert sur la Figure 25. Les autres raies identifiables sont les raies (002), (112), (300) et (202) de l'HA dont les positions et intensités relatives sont mentionnées dans le Tableau 13.

Tableau 13. Distances interréticulaires $d_{\text{théorique}}$ et intensités relatives des principales raies du β -TCP [PDF n°9-0169], du β -CPP [PDF n°9-0346] et de l'HA [PDF n°9-0432]

$d_{\text{théorique}}$ (Å)	I/I_0			raie (hkl)		
	β -TCP	β -CPP	HA	β -TCP	β -CPP	HA
5,21	20			110		
4,06	16			024		
3,45	25			<u>1010</u>		
3,44			40			002
3,34		35			200	
3,31		35			201	
3,22		50			202	
3,21	55			214		
3,09		45			203	
3,02		100			008	
3,01	16			300		
2,966		30			211	
2,903		30			212	
2,88	100			<u>0210</u>		
2,81			100			211
2,78			60			112
2,76	20			128		
2,749		45			205	
2,72			60			300
2,63			25			202
2,61	65			220		
2,26			20			310
1,94			30			222
1,84			40			213
1,81			20			321
1,72			20			004

II.3.2. La détermination du rapport molaire Ca/P des ANB

II.3.2.a. *Par la méthode de diffraction des rayons X*

La détermination du rapport atomique Ca/P d'une apatite par diffraction des rayons X est une méthode bien connue [Raynaud2001]. La norme (AFNOR ISO 13779-3 (2008), Association Française de NORmalisation) [AFNOR2008] permet le contrôle de la pureté d'un matériau cristallisé d'hydroxyapatite. Le comportement des phosphates de calcium à haute température est également bien connu : par calcination à 900°C, un solide, de rapport molaire Ca/P compris entre 1,50 et 1,667, se décompose en du phosphate tricalcique β et de l'HA. Dans le cas où le matériau serait biphasé (HA / β -TCP), pour déterminer le rapport Ca/P compris entre 1,5 et 1,667, la norme utilise le fait que les raies de plus grande intensité de l'HA ($2\theta = 2,81$ Å) et du β -TCP ($2\theta = 2,88$ Å) sont dissociées et visibles même dans le cas de faibles proportions.

Nous avons tenté de déterminer le rapport Ca/P, à partir de la diffraction des rayons X, pour chaque matériau obtenu à partir des ANB calcinées. Les diffractogrammes ont été collectés avec la radiation $K\alpha$ du cuivre ($CuK\alpha_1$ 1,54056 Å) sur un diffractomètre $\theta/2\theta$ Siemens équipé d'un monochromateur. Un pas de $0,02^\circ$ en 2θ , pour un temps de comptage de 6s, a été fixé sur l'intervalle [25 - 35°]. Le rapport R_1 des intensités relatives des pics de diffraction caractéristiques des phases cristallines en présence est utilisé [Raynaud2001], pour les mélanges biphasés HA + β -TCP :

$$R_1 = \frac{I_{HA(211)}}{I_{\beta-TCP(0210)}}$$

Les pics de diffraction retenus pour calculer ces rapports d'intensité sont :

le pic de diffraction de la raie (0210) du β -TCP, d'intensité relative 100 % à $2\theta = 31,0^\circ$,

le pic de diffraction de la raie (211) de l'HA, d'intensité relative 100 % à $2\theta = 31,8^\circ$.

Le rapport R_1 est fonction des pourcentages massiques des phases en présence. Le seuil de détection de l'HA par diffraction des rayons X est de 0,5 % massique [Raynaud2001], tandis que le β -TCP n'est quantifiable qu'entre 10 % et 4 % massique [Destainville2003].

Dans le cas des ANB mûrées 3 jours, 5 jours et 1 semaine, la raie (202) du β -CPP n'est pas séparable du bruit de fond. Cela laisse présager un pourcentage massique de β -CPP $\leq 4\%$, ce qui correspond à un Ca/P compris entre 1,476 et 1,5 (= Ca/P du β -TCP pur).

Dans le cas des ANB mûrées 20 minutes, 3 heures et 1 jour, la raie (202) du β -CPP apparaît clairement. La teneur en β -CPP doit être au-delà de la limite établie par Destainville, c'est-à-dire supérieure à 10 % massique (soit un Ca/P $< 1,44$).

La méthode de détermination du rapport molaire Ca/P par la méthode des DRX [Raynaud2001] appliquée au matériau biphasé HA + β -TCP, obtenu à partir de la calcination de l'ANB mûrée 3 semaines, conduit à une valeur évaluée à 1,539.

Cependant le suivi des raies isolées (0210) pour le β -TCP, (203) pour le β -CPP, (211) pour l'HA, respectivement encadrées en bleu, violet et vert sur la Figure 25 et le Tableau 13 montrent que la teneur en phase cristalline β -CPP diminue quand le temps de maturation augmente, et que la teneur en phase cristalline d'hydroxyapatite n'est détectable que pour la plus longue maturation. Le profil des diffractogrammes permet ainsi de hiérarchiser les ANB mûrées (Figure 26) et de les classer par rapport au Ca/P molaire des matériaux de référence (Tableau 12).

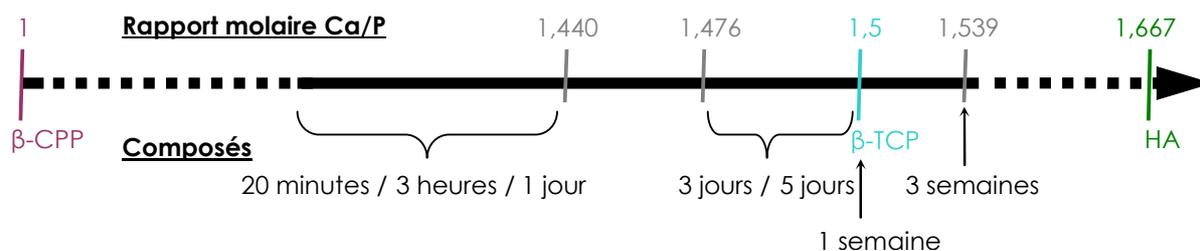


Figure 26. Classement des ANB mûrées pendant différentes durées, en fonction du rapport Ca/P molaire des matériaux de référence de rapport compris entre 1 et 1,667

En vue de connaître précisément la composition chimique des ANB en fonction du temps de maturation, une détermination plus précise a été envisagée, par dosage chimique des ions calcium et des ions phosphate.

II.3.2.b. Par la méthode des dosages chimiques

Les teneurs en ions calcium et orthophosphate (PO_4^{3-} et HPO_4^{2-}) ont été déterminées pour tous les échantillons.

★ Dosage des ions calcium par complexométrie

Les ions calcium ont été dosés par complexométrie [Charlot1966, Meyer1978]. L'agent complexant est le sel disodique de l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), introduit en excès et en présence d'ammoniaque. L'excès d'EDTA est ensuite dosé par une solution titrée de chlorure de zinc. L'indicateur de virage est le noir ériochrome. L'erreur relative sur la détermination de la teneur en ions calcium est de l'ordre de 0,5 %.

★ Dosage des ions phosphate par colorimétrie

Les ions phosphate présents dans les poudres d'ANB sont sous forme d'ions orthophosphate. Ils ont été dosés par colorimétrie selon la méthode de Gee et Dietz [Gee1953]. L'analyse par spectrophotométrie d'absorption dans le visible ($\lambda = 460 \text{ nm}$) repose sur la formation d'un complexe phosphovanadomolybdique $\text{VO}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$, de couleur jaune, formé en milieu acide. Les absorbances des différentes solutions sont mesurées, dans des cuves en quartz, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Hitachi Scientific Instruments U-1100 à simple faisceau. L'erreur relative sur le dosage des ions orthophosphate est de l'ordre de 0,5 %.

Entre l'ANB maturée 20 minutes et celle maturée 3 semaines, le rapport molaire Ca/P croît de 1,42 à 1,53 (Tableau 14).

Tableau 14. Rapports molaires Ca/P des ANB obtenues après différents temps de maturation, et phases cristallines en présence après décomposition thermique pendant 15h à 1000°C [AFNOR2008]

Temps de maturation	Rapport molaire Ca/P	Phases en présence après décomposition à 1000°C/15h
20 minutes	1,42(5)	β -TCP + β -CPP
3 heures	1,42(4)	β -TCP + β -CPP
1jour	1,43(9)	β -TCP + β -CPP
3 jours	1,47(6)	β -TCP + β -CPP
5 jours	1,48(6)	β -TCP + β -CPP
1 semaine	1,49(0)	β -TCP
3 semaines	1,53(6)	β -TCP + HA

Les résultats obtenus sont en conformité avec les observations faites sur les différentes maturations, calcinées à 1000°C pendant 15h (Figure 25). L'ANB maturée pendant 3 semaines est la seule à avoir un rapport supérieur à 1,5 (= Ca/P des phosphates tricalciques), ce qui corrobore l'apparition d'hydroxyapatite après calcination.

★ **Distinction entre les différents types d'ions orthophosphate**

La valeur de la teneur en ions hydrogénophosphate résulte du dosage des ions orthophosphate totaux réalisé précédemment, et du dosage des ions PO_4^{3-} uniquement, après condensation des ions hydrogénophosphate en ions pyrophosphate non dosables par cette méthode. Cette méthodologie est couramment utilisée au laboratoire CIRIMAT (Annexe) et permet ainsi de dissocier les deux types d'ions orthophosphate (PO_4^{3-} et HPO_4^{2-}) en fonction du temps de maturation. Rappelons que dans une apatite de formule générale $\text{M}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Z}_2$, les lacunes sont présentes uniquement en site M^{2+} et Z , et n'ont jamais été détectées, à notre connaissance, en site XO_4^{3-} car ces anions volumineux assurent le maintien de la structure apatite. Dans le cas des phosphates de calcium, les sites XO_4^{3-} , au nombre de 6 par maille, sont occupés par des ions orthophosphate PO_4^{3-} et HPO_4^{2-} . En partant du principe que la structure globale est électriquement neutre, par un mécanisme de compensation des charges [Montel1981], la présence d'anions bivalents (HPO_4^{2-}) en site XO_4^{3-} , engendre la création de lacunes en sites M^{2+} et Z . La Figure 27 montre le taux d'occupation des 6 sites XO_4^{3-} présents dans la maille d'apatite, par les 2 types d'anions orthophosphate (PO_4^{3-} et HPO_4^{2-}), en fonction du temps de maturation des ANB.

Quel que soit le temps de maturation des ANB, les sites XO_4 sont majoritairement occupés par des ions PO_4^{3-} (bien que la teneur en HPO_4^{2-} ne soit pas négligeable). La diminution de la teneur en ions hydrogénophosphate, avec le temps de maturation, est en accord avec les valeurs mentionnées dans le Tableau 15, pour des ANB synthétisées dans une autre étude dans des conditions similaires [Farlay2010].

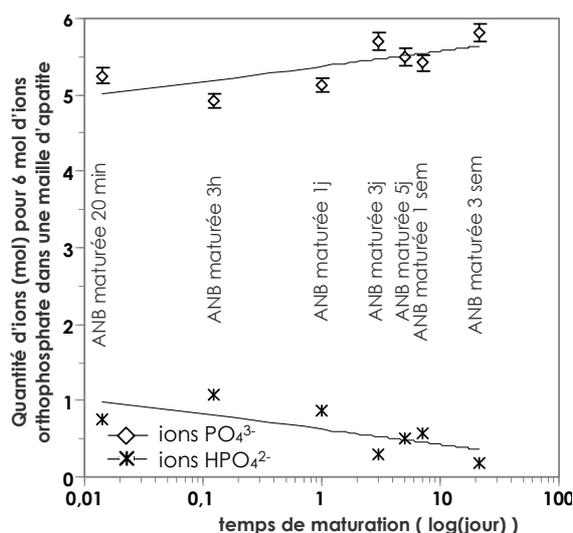


Figure 27. Dosage des ions orthophosphate PO_4^{3-} et HPO_4^{2-} dans les ANB, mûries pendant différentes durées

Au cours de la maturation, les ions HPO_4^{2-} sont quant à eux progressivement remplacés par des ions PO_4^{3-} . Par conséquent, la composition des ANB tend vers la stœchiométrie, lorsque le temps de maturation augmente.

Tableau 15. Comparaison de la teneur en ions HPO_4^{2-} dosés ci-dessus avec les valeurs obtenues par Farlay et al., dans des ANB présentant différents temps de maturation

Temps de maturation	HPO_4^{2-} (%)	HPO_4^{2-} (%) [Farlay2010]
0 jour		22
20 minutes	17,1	
3 heures	17,1	
1 jour	18,6	22,8
3 jours	12,5	18,4
5 jours	16,0	
1 semaine	14,9	
2 semaines		13
3 semaines	12,0	
2 mois		9,8

II.3.3. L'analyse thermogravimétrique

Le comportement thermique des différentes ANB mûries a été suivi par analyse thermogravimétrique (ATG) réalisée sous air sur un appareillage Setaram SETSYS Evolution. L'acquisition des données est réalisée avec une vitesse de montée en température de $2,5^\circ\text{C}/\text{min}$

jusqu'à 900°C. Les expériences sont effectuées dans des creusets en platine et les masses de poudres analysées sont adaptées au volume du creuset. Un blanc est réalisé avec le creuset contenant une poudre d'alumine inerte. Ce blanc est ensuite retranché des analyses TG des échantillons.

Les courbes obtenues par analyse thermogravimétrique (Figure 28) permettent d'observer trois pertes de masse principales. La première (Δm_1), entre 25°C et 300°C correspond à la perte d'eau faiblement liée (physisorbée) sur les nanocristaux et à l'eau associée aux environnements non-apatitiques (couche hydratée). La deuxième perte de masse (Δm_2) observée entre 300°C et 650°C correspond à la condensation des ions HPO_4^{2-} en ions $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ selon la réaction ci-dessous (réaction totale) ; voire à des résidus d'eau plus fortement liée, peut-être intracristalline [Heughebaert1977].



La troisième perte de masse (Δm_3) se produit entre 650°C et 750°C. Elle correspond à la réaction des ions $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ avec les ions OH^- du cœur apatitique de l'ANB, initialement présents dans la poudre [Winand1961], selon la réaction suivante :



Pour cette dernière réaction il faut différencier les cas où l'une ou l'autre des deux espèces est limitante. Tandis que le cas n°1, présenté ci-dessous, décrit la réaction lorsque les ions OH^- sont limitants, le cas n°2 la décrit lorsque les ions $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ sont concernés.

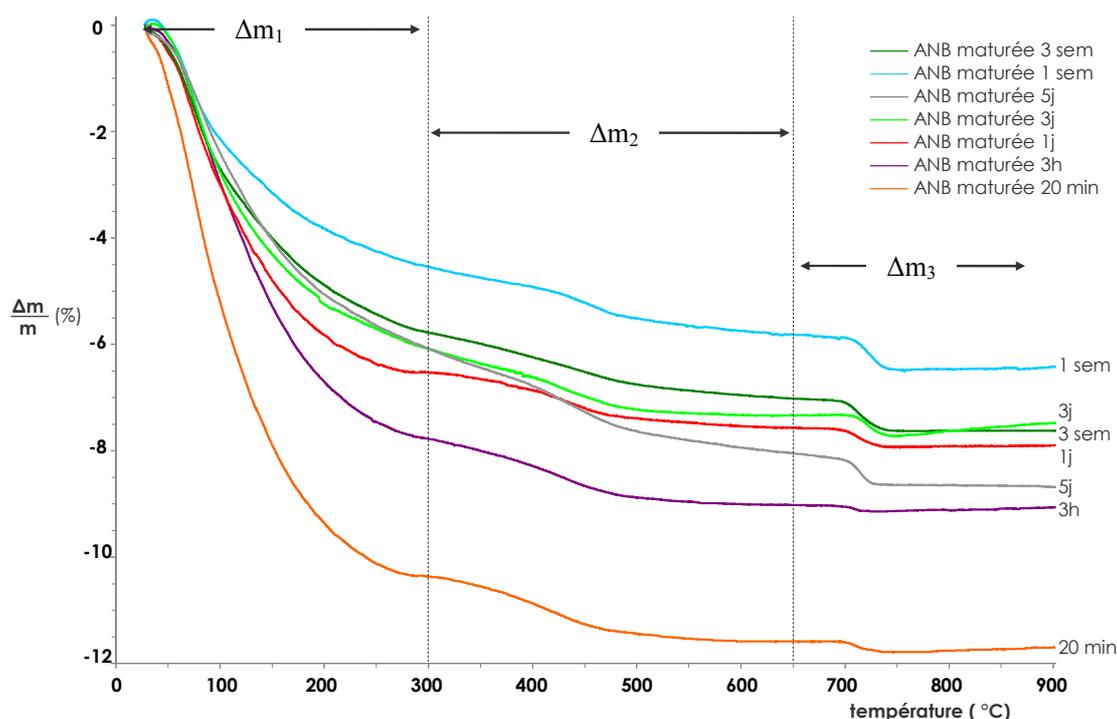


Figure 28. Courbes de perte de masse obtenues par ATG, pour chaque ANB mûrifiée

Cas n°1 : Si les ions hydroxyde sont limitants, après leur consommation pour l'hydrolyse partielle des ions pyrophosphate, il restera des ions $P_2O_7^{4-}$ dans la poudre après décomposition thermique. Les ions PO_4^{3-} formés contribuent à la formation de phosphate tricalcique, tandis que les ions $P_2O_7^{4-}$ en excès forment le pyrophosphate de calcium. Cette décomposition thermique correspond au comportement à haute température d'une apatite non-stœchiométrique de rapport atomique $Ca/P < 1,5$ (§ I.1.5.a) [Banu2005]. Dans ce cas, la perte d'eau Δm_3 permet d'évaluer la teneur initiale en ions OH^- de la phase apatitique.

Cas n°2 : Si les ions pyrophosphate (soient les ions HPO_4^{2-} initiaux) sont limitants, après formation des ions PO_4^{3-} , il restera des ions hydroxyde non consommés. Les ions PO_4^{3-} ainsi formés contribuent à la formation de phosphate tricalcique, de la même façon que dans le cas n°1, tandis que les ions OH^- restant participent à la formation d'hydroxyapatite. Cette décomposition thermique correspond au comportement à « haute température » d'une apatite non-stœchiométrique de rapport atomique $Ca/P > 1,5$ (§ I.1.5.a) [Gibson2000, Raynaud2002]. Dans ce cas, la perte d'eau Δm_3 permet d'évaluer la teneur en ions HPO_4^{2-} dans la poudre initiale.

Au regard des diffractogrammes des poudres d'ANB après calcination à $1000^\circ C$ (Figure 25) et des rapports atomiques Ca/P obtenus par dosage chimique pour chaque ANB mûrifiée (§

II.3.2.b), il est possible de conclure que pour les temps courts et jusqu'à une semaine de maturation, la réaction correspondant au Δm_3 se déroule selon le cas n°1 (ions OH^- limitants), contrairement à l'ANB maturée pendant 3 semaines qui suit le cas n°2 (ions HPO_4^{2-} limitants).

Les courbes obtenues par analyse thermogravimétrique (Figure 28) permettent d'évaluer la quantité d'eau résiduelle (eau adsorbée sur les nanocristaux et eau associée aux environnements non-apatitiques) associée à la poudre, et de suivre son évolution en fonction du temps de maturation (Δm_1 sur la Figure 29). Il n'a pas été possible de distinguer ici les différents types de molécules d'eau. La courbe de suivi de Δm_1 montre une diminution avec le temps de maturation de l'ANB, particulièrement marquée au cours des premiers jours de maturation. En supposant que l'influence du temps de maturation sur la quantité d'eau physisorbée à la surface des nanocristaux reste négligeable, la variation de Δm_1 entre les différentes ANB maturées s'explique par une diminution de l'eau contenue dans la couche hydratée lorsque l'ANB est maturée plus longuement.

Lorsque le temps de maturation des ANB est plus long, la diminution globale de Δm_2 montre que la teneur en ions HPO_4^{2-} diminue, tandis que l'augmentation de Δm_3 indique que la teneur en ions hydroxyde augmente (Figure 29). Ces évolutions sont en accord avec l'augmentation du rapport Ca/P, et avec l'évolution vers la stœchiométrie.

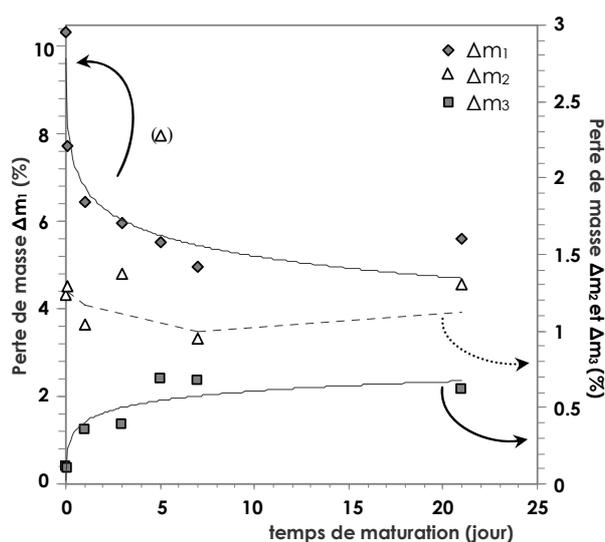


Figure 29. Suivi des différentes pertes de masse au cours de la décomposition thermique par ATG, pour chaque ANB maturée

La réaction de condensation qui conduit à la perte de masse Δm_2 n'est pas simple à isoler puisque la réaction débute avant que la perte de masse Δm_1 ne semble totalement terminée. Cependant il reste possible en première bonne approximation, de les séparer et d'estimer la quantité d'eau présente dans les échantillons, à partir de Δm_1 . Les valeurs de Δm_3 obtenues pour chaque ANB maturée permettent de calculer la quantité d'ions ayant réagi, qui correspond, par conséquent, à la quantité de l'espèce limitante (entre 650-750°C), selon qu'il s'agisse du cas n°1 ou 2.

En tenant compte des résultats des précédentes caractérisations physico-chimiques (dosages chimiques, DRX, ATG) de chaque ANB maturée, et en s'appuyant sur le principe d'électroneutralité d'une mole d'apatite, il est possible d'en déduire les quantités de chaque espèce ionique, en fonction du temps de maturation (Figure 30). Un écart existe entre les ions phosphate dosés et ceux déterminés à partir de l'ATG (Figure 30A pour les ions PO_4^{3-} , Figure 30B pour les ions HPO_4^{2-}). Rappelons que les ions HPO_4^{2-} sont déduits du dosage des ions orthophosphate totaux (ions PO_4^{3-} + ions HPO_4^{2-}) moins le dosage des ions PO_4^{3-} seuls (Annexe, § II.b). Par conséquent, les valeurs plus élevées (aux valeurs obtenues par ATG) du dosage des ions PO_4^{3-} seuls sont cohérentes avec les valeurs inférieures (aux valeurs obtenues par ATG) du dosage des ions HPO_4^{2-} seuls. Plus précisément, pour chaque maturation, le même écart relatif (pour une structure apatite avec 6 moles de P) est répercuté entre la valeur dosée et la valeur issue de l'ATG dans le cas des ions PO_4^{3-} et des ions HPO_4^{2-} (Tableau 16). Il s'agit alors probablement d'une erreur systématique directement liée à l'expérience de dosage elle-même : Il semblerait qu'une faible quantité d'ions HPO_4^{2-} ne se soit pas condensée sous forme d'ions $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$. Les ions non condensés sont ainsi comptabilisés avec les ions PO_4^{3-} . Cela induit une sur-évaluation des ions PO_4^{3-} tandis que les ions HPO_4^{2-} sont sous-évalués.

Tableau 16. Ecart relatif (% pour une mole d'apatite avec 6 moles de P) entre les ions phosphate dosés et calculés à partir de l'ATG

ANB maturée	ANB 20 min	ANB 3 h	ANB 1 j	ANB 3 j	ANB 5 j	ANB 1 sem	ANB 3 sem
écart (ions PO_4^{3-})	+4,75 %	-0,74 %	+4,16 %	+7,64 %	+7,57 %	+5,15 %	+8,81 %
écart (ions HPO_4^{2-})	-4,71 %	+0,78 %	-4,13 %	-7,61 %	-7,58 %	-5,17 %	-8,85 %

L'évolution des différentes espèces ioniques avec la maturation indique que la composition chimique des ANB tend vers la stoechiométrie lorsque le temps de maturation est allongé ; cela se traduit par une augmentation des teneurs en espèces ioniques Ca^{2+} , PO_4^{3-} (Figure 30A) et OH^- (Figure 30B). En maturant, le déficit en ions Ca^{2+} des ANB diminue, en effet l'augmentation de la teneur en ions Ca^{2+} (Figure 30A) est simultanée à la diminution de la teneur en ions HPO_4^{2-} (Figure 30B).

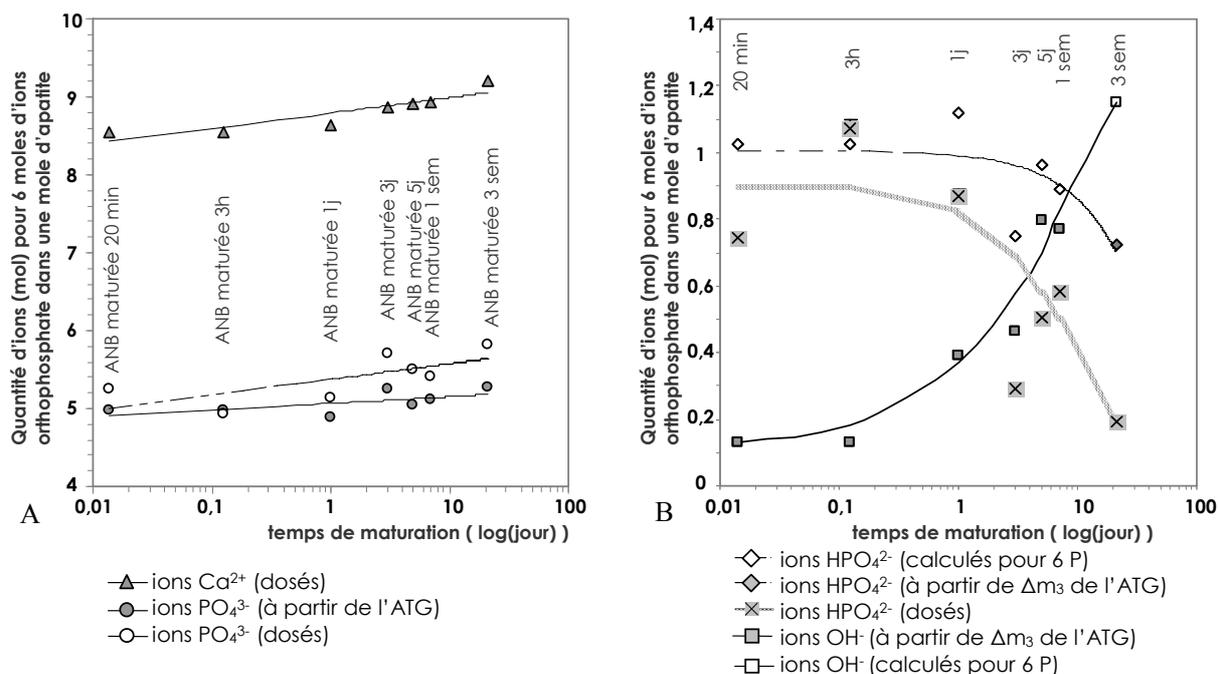


Figure 30. Quantités d'espèces ioniques Ca^{2+} et PO_4^{3-} calculées à partir du rapport atomique Ca/P, et comparées avec PO_4^{3-} dosés (A), et HPO_4^{2-} dosés comparé avec HPO_4^{2-} et OH^- calculées à partir de Δm_3 en ATG ou en considérant l'électronéutralité de la maille d'apatite (B) contenant les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} dosés en (A)

Les résultats de dosages par spectroscopie UV, des ions PO_4^{3-} et HPO_4^{2-} sont plus dispersés et nous servent uniquement à confirmer la conformité des quantités obtenues par ATG et/ou calculées en considérant l'électronéutralité d'une unité formulaire d'apatite contenant 6 moles d'ions phosphate.

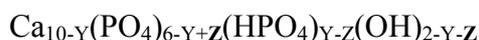
La composition chimique de chaque ANB, retenue pour la suite des travaux, est reportée sur le Tableau 17.

Tableau 17. **Composition chimique des ANB**

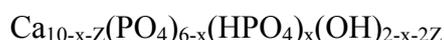
Temps de maturation	Rapport molaire Ca/P	En nombre de moles par unité formulaire d'apatite (hydratée)				
		Ca ²⁺	PO ₄ ³⁻	HPO ₄ ²⁻	OH ⁻	H ₂ O*
20 minutes	1,43	8,55	4,97	1,03	0,13	5,94
3 h	1,42	8,54	4,97	1,03	0,12	4,18
1 jour	1,44	8,64	4,88	1,12	0,39	3,60
3 jours	1,48	8,86	5,25	0,75	0,46	3,53
5 jours	1,49	8,92	5,04	0,96	0,80	3,21
1 semaine	1,49	8,94	5,11	0,89	0,77	2,86
3 semaines	1,54	9,21	5,28	0,72	1,15	3,28

* déterminé à partir des analyses thermiques

La formule chimique générale Ca_{10-Y}(PO₄)_{6-Y}(HPO₄)_Y(OH)_{2-Y} est souvent utilisée pour décrire en première approximation les apatites phosphocalciques non-stœchiométriques. Dans cette formule, la somme des teneurs en ions OH⁻ et en HPO₄²⁻ vaut alors 2. Cette formule semble néanmoins montrer quelques limites pour décrire les apatites à faibles temps de maturation. La comparaison entre cette formule théorique et les valeurs expérimentales (Tableau 17) montre qu'il est nécessaire d'introduire un paramètre « Z » tel que :



L'introduction de ce paramètre rend compte du fait que la compensation de charge liée aux lacunes en cations bivalents est davantage liée au faible remplissage des tunnels apatitiques en ions OH⁻ qu'à la protonation d'ions PO₄³⁻ en HPO₄²⁻. En posant x = Y-Z, on retrouve la notation équivalente suivante, déjà proposée par Kühl et Nebergall [Kühl1963] :



Soit encore, en prenant en compte la présence de « n » molécules d'eau dans les poudres à l'issue de la lyophilisation :



Afin de mieux différencier la composition chimique du cœur apatitique et de la couche hydratée, et de suivre l'évolution des différents environnements ioniques en fonction du temps

de maturation, nous nous sommes intéressés aux méthodes de spectroscopie vibrationnelle, notamment la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

II.3.4. La spectroscopie vibrationnelle FTIR

Les différentes techniques de spectroscopie vibrationnelle permettent d'obtenir des informations sur la matière à partir de son interaction avec le rayonnement incident, émis avec une fréquence donnée. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ou FTIR) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau étudié. Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des molécules, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

Lorsque la longueur d'onde apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration d'une liaison chimique, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise

Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée on peut déterminer les modes de vibration actifs en infrarouge grâce à la Théorie des Groupes. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse.

Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau. Les longueurs d'onde auxquelles l'échantillon absorbe, sont caractéristiques des groupes chimiques présents dans le matériau analysé et de leur environnement. Un même groupe peut donner lieu à plusieurs types de vibrations et donc à des absorptions à différentes fréquences.

II.3.4.a. *Rappels bibliographiques*

Les ions libres PO_4^{3-} possèdent une symétrie tétraédrique et 4 modes fondamentaux de vibration, à 938 cm^{-1} (ν_1 , mode élongation symétrique de la liaison P–O), 420 cm^{-1} (ν_2 , mode déformation angulaire de la liaison O–P–O), 1017 cm^{-1} (ν_3 , mode élongation antisymétrique de la liaison P–O) et 567 cm^{-1} (ν_4 , mode déformation angulaire de la liaison O–P–O) [Fowler1974, Nakamoto1997, Cusco1998]. La symétrie de l'ion phosphate est diminuée lorsqu'il se trouve dans un environnement apatitique [Winston1949] et il existe des couplages forts entre les modes de vibration des ions PO_4^{3-} dans la maille élémentaire qui modifient le profil du spectre de vibration [Blakeslee1971, Rey1990].

Pour chaque mode de vibration des groupements phosphate, les massifs peuvent être décomposés en plusieurs bandes de vibration. Certains auteurs ont utilisé la dérivée seconde du spectre d'absorption IR de l'hydroxyapatite stœchiométrique afin d'identifier les différentes bandes de vibration constitutives des massifs dans les régions spectrales $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$, $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ et $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$. Le Tableau 18 mentionne les positions des pics identifiés, et leur attribution selon la littérature. Au delà des attributions, il est possible d'analyser les paramètres d'une bande en termes de hauteur, largeur à mi-hauteur, intensité intégrée, et ainsi de comparer les bandes entre elles à l'aide de ratios. De part sa morphologie asymétrique, ou par la présence d'un épaulement révélant l'addition de plusieurs signaux, une bande peut être amenée à être décomposée mathématiquement. Suivant les paramètres cités ci-dessus, les pics décomposés peuvent être comparés entre eux. Les attributions, et par la suite, les interprétations varient selon les auteurs, surtout pour les tissus biologiques rendus plus compliqués à analyser par la présence de la phase organique (exemple de la dentine ou de l'os). Les vibrations asymétriques donnent lieu à des régions complexes liées à la multiplicité des signaux. Le Tableau 18 référence les attributions des pics identifiés au sein des bandes d'absorption IR de l'HA stœchiométrique et d'apatites nanocristallines (biologiques et synthétiques ou ANB), dans le domaine spectral $\nu_2\nu_4$ des groupements phosphate PO_4 et ν_L des ions hydroxyde. Les incertitudes des attributions touchent essentiellement les apatites non-stœchiométriques substituées car les distorsions créées par des environnements ioniques différents induisent des bandes larges qui limitent la résolution des bandes [Eichert2007]. Pour des apatites non-stœchiométriques, la présence d'ions HPO_4^{2-} et de sites vacants dans le réseau, complexifient la différenciation des groupements phosphate.

Tableau 18. Positions des pics d'absorption IR (en cm^{-1}), dans l'HA stœchiométrique et les apatites nanocristallines, dans les régions spectrales ν_2 , ν_4 des phosphates, bandes de libration (ν_L) et de translation (ν_T) des ions OH^- apatitiques, et leur attribution selon la littérature

Attributions	[Fowler1966]	[Fowler1974]	[Nelson1982]	[Leung1990]	[Miller2001] ^s	[Markovic2004] ^s	[Eichert2007]	[Nelson1982]	[Rey1990] ^s	[Ou-Yang2000] ^s	[Miller2001] ^b	[Banu2005] ^s	[Eichert2007]
	HA stœchiométrique							Apatite nanocristalline					
ν_{tOH}						342							
$\nu_2\text{PO}_4$			462 474	476		462 474	464 474					470	469
HPO_4 non- ap									525-535		≈ 530	535	533
HPO_4 ap									540-550	540	535-540	550	551
$\nu_4\text{PO}_4$	574	574*	565 574	569 574 588	564 576	565.1 575.3 586.4	567 572	656 581	560 575 585 ^f	563 575 587 ^{TC Pam}	560 578	560 575	562 575
	602		602	602** 615	603 615	601.8 605.4	602	606	600	603	603	601	603
PO_4 non- ap								617	610-615	617	615		617
									620-625 ^f				
$\nu_{\text{L}}\text{OH}$	632		632		632	633	633	630		632	632		

ap : apatitique * (corrélée à $\nu_{\text{L}}\text{OH}$) **position controversée [Iqbal1977] s : apatite de synthèse

b : apatite biologique f : bande de faible intensité, visible dans les apatites « s » ou « b » jeunes

En comparaison avec la bande de vibration $\nu_4\text{PO}_4$ sur le spectre IR de l'HA stœchiométrique, les apatites nanocristallines biologiques [Terminé1973] (principalement peu matures) et/ou de synthèse [Fowler1960] montrent plusieurs bandes supplémentaires de part et d'autre de cette bande de vibration [Rey1990].

A haut nombre d'onde (dans le domaine spectral $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$), Rey et al. [Rey1990] décrit pour la première fois une bande à $610\text{-}615\text{ cm}^{-1}$. Cette bande est identifiée à la fois sur les spectres d'apatite biologique après déprotéination et de phosphates de calcium synthétiques, par conséquent cette bande ne peut correspondre à la matière organique [Rey1990]. En considérant plus particulièrement l'émail jeune (dépourvu d'ions OH^- [Blumenthal1973, Legros1986]), cette bande est bien visible, avec un maximum à 610 cm^{-1} , et attribuée aux ions

PO_4^{3-} . Notons que cette bande diminue d'intensité avec le vieillissement des apatites biologiques et la maturation des ANB [Rey1990].

Rappelons quelques structures cristallines de phosphates de calcium (CaP) de référence :

→ la structure de la brushite, ou phosphate dicalcique dihydraté ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) :

Elle se présente sous forme de feuillets ondulés de composition CaHPO_4 , arrangés parallèlement les uns aux autres, et liés entre eux par une double couche de molécules d'eau.

→ La structure du phosphate octocalcique, ou OCP ($\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) :

Elle est composée de deux couches, une couche dite apatitique, très proche de l'hydroxyapatite et une couche dite hydratée contenant notamment toutes les molécules d'eau. La couche hydratée comporte des ions phosphate et calcium très espacés environnés de molécules d'eau. Les ions phosphate contenus dans la couche hydratée et à l'interface sont protonnés (HPO_4^{2-}). Ces couches sont liées entre elles essentiellement par des liaisons hydrogène [Fowler1993]. L'OCP possède deux types d'environnements pour les ions HPO_4^{2-} [Brown1962a]. Etant donné la structure de l'OCP, un environnement HPO_4 correspondrait à la couche hydratée de l'OCP et serait voisin des environnements phosphate dans la brushite, tandis que l'autre environnement HPO_4 correspondrait à la couche apatitique et serait similaire à celui d'une apatite déficitaire en ions calcium (avec des ions HPO_4^{2-}) [Rey1990].

Le Tableau 19 montre les bandes supplémentaires de la bande $\nu_4\text{PO}_4$ pour chaque composé possédant des groupements HPO_4 .

Tableau 19. Position des bandes supplémentaires de décomposition, dans le domaine spectral $\nu_4\text{PO}_4$, pour chaque CaP apatitique et non-apatitique possédant des groupements HPO_4 [Rey1990]

Attributions	brushite	OCP	β -TCP	whitlockite	apatite avec HPO_4^{2-} ap
HPO_4^{2-} non-ap	530	530			
HPO_4^{2-} ap		545			550
PO_4^{3-} non-ap (indépendant des HPO_4^{2-})		610-615	610-615	610-615	/

ap = apatitique

La présence de deux bandes supplémentaires, observées aux faibles nombres d'ondes (dans le domaine spectral $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$) dans les apatites nanocristallines, rappelle l'intercalation des

couches hydratées / apatitiques de l'OCP, mais l'intensité de la bande à 610-615 cm^{-1} diffère, donc la composition des apatites nanocristallines est différente de celle de l'OCP.

C'est la connaissance précise de la position des bandes de décomposition spectrale de la bande de vibration ν_4 des groupements PO_4 pour l'HA stœchiométrique, et la comparaison des bandes supplémentaires identifiées dans les apatites nanocristallines (biologiques et de synthèse) avec des CaP de référence, qui a permis l'attribution des bandes.

II.3.4.b. Résultats

Les environnements ioniques des ions phosphate ont été analysés par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Les poudres initiales ont été caractérisées avec un spectromètre FTIR Nicolet 5700. Tous les échantillons ont été analysés sous forme de poudre dispersée dans une pastille de KBr entre 4000 et 400 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de scans de 64. Les spectres ont été acquis avec une absorbance maximale de l'ordre de $1 \pm 0,2$.

Les bandes d'absorption IR caractéristiques des apatites bien cristallisées telle l'HA (Figure 31A) et communes aux ANB (Figure 31B) ont été clairement identifiées dans des travaux antérieurs [Fowler1974, Leung1990, Rey1990, Rey1991b, Penel1997]. Plusieurs domaines spectraux sont distincts et communs à l'ensemble des apatites phosphocalciques hydroxylées, fluorées, carbonatées en totalité ou en mélange : régions 3510-3560 cm^{-1} , 1100-900 cm^{-1} et 650-400 cm^{-1} [Rey1989, Rey1990, Penel1997].

Une première analyse des spectres FTIR relatifs aux poudres initiales d'ANB (Figure 31) indique la présence de bandes d'absorption IR caractéristiques attribuables aux modes de vibration des groupements PO_4^{3-} dans la structure apatitique : 1081 et 1030 cm^{-1} (mode $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$), 960 cm^{-1} (mode $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$), 601 et 570 cm^{-1} (mode $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$) et 474 cm^{-1} (mode $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$). Les bandes $\nu_3\text{PO}_4$ et $\nu_4\text{PO}_4$ sont les plus intenses et les plus sensibles à leur environnement. Dans les apatites faiblement cristallisées comme l'os, la bande $\nu_1\text{PO}_4$ apparaît comme un épaulement de la $\nu_3\text{PO}_4$, et la bande $\nu_2\text{PO}_4$ s'évanouit au pied de la bande $\nu_4\text{PO}_4$ [Tochon1979]. L'introduction d'ions HPO_4^{2-} dans la structure apatitique se traduit par des distorsions du tétraèdre formé par l'ion libre PO_4^{3-} . Leur présence est visible sur le spectre IR

avec l'apparition de bandes attribuables aux ions HPO_4^{2-} , en particulier à 1180, 1250 et 875 cm^{-1} .

On note également la présence de bandes caractéristiques dues aux ions OH^- : mode de libration, ν_L à 630 cm^{-1} et mode élongation, ν_S à 3560 cm^{-1} . Les bandes d'absorption des ions OH^- apparaissent comme des élargissements des bandes voisines. De plus l'intensité et la largeur des bandes correspondant aux molécules d'eau (1630 et 3000 – 3400 cm^{-1}) sont très importantes. Les spectres IR révèlent la présence d'eau dans les ANB [LeGeros1978, Nakamoto1997]. Selon Joris et al., la largeur de la bande correspondant au mode d'élongation de la liaison O-H est liée à une liaison hydrogène entre l'eau adsorbée et un groupement hydroxyde de l'apatite [Joris1971].

La présence des ions HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} et OH^- au sein des ANB, est cohérente avec le fait qu'il s'agit d'apatites non-stœchiométriques. Le caractère hydraté ainsi que la largeur des bandes qui révèle une faible cristallinité des ANB, rappellent le spectre d'une apatite biologique [Rey1989,1990,1991b]. Les premières identifications effectuées sur les spectres d'absorption IR des ANB confirment qu'il s'agit d'apatites nanocristallines comparables aux apatites biologiques.

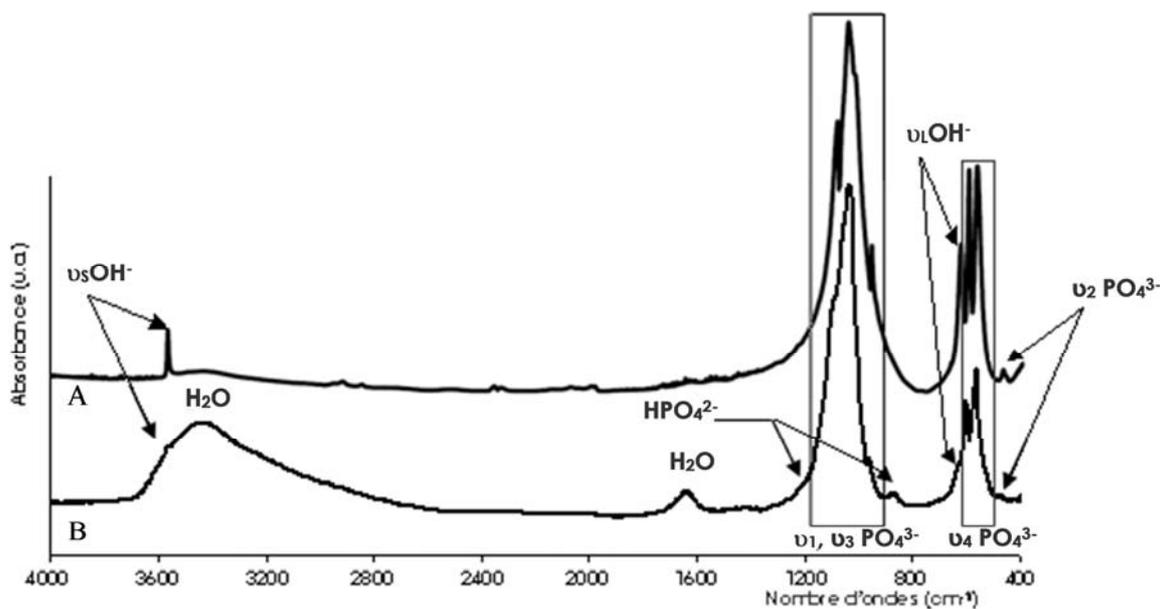


Figure 31. Spectre d'absorption infrarouge de l'hydroxyapatite stœchiométrique (A) et d'une ANB maturée 1 semaine (B)

★ **La décomposition de la région spectrale autour de la bande $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$**

Selon Kauppinen, le domaine spectral autour de la bande $\nu_4\text{PO}_4$ est préférentiellement étudié car il est non seulement plus facile à décomposer mathématiquement que celui de la bande $\nu_3\text{PO}_4$ [Kauppinen1981], mais il donne également des informations sur les ions HPO_4^{2-} [Rey1990]. La décomposition mathématique spectrale consiste à ajuster les différentes bandes afin que le modèle mathématique suive le spectre original. Elle permet ainsi d'améliorer la résolution des bandes qui se chevauchent, en modifiant une à une la largeur de bande de chaque composant du massif de bandes et de suivre les proportions relatives de chaque contribution.

La région spectrale englobant les modes de vibrations ν_2 et ν_4 des groupements phosphate PO_4^{3-} a donc été choisie pour la décomposition mathématique des spectres car les différents types d'environnement chimique des ions phosphate y sont particulièrement visibles, de plus la bande ν_4 présente une largeur de bande bien adaptée à la décomposition [Rey1990]. Par la suite nous noterons ce domaine spectral $\nu_2\nu_4\text{PO}_4^{3-}$.

→ Méthodologie

Les décompositions spectrales [Kauppinen1981] pour l'HA stœchiométrique, ainsi que pour les poudres d'ANB obtenues après différents temps de maturation ont été réalisées à l'aide du logiciel ORIGIN[®], afin de suivre l'évolution des environnements chimiques (apatitiques et non-apatitiques) en fonction du temps de maturation. Après soustraction d'une ligne de base linéaire, la décomposition mathématique est réalisée entre 800 et 400 cm^{-1} (Figure 32) car la $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$ ne peut pas être dissociée du massif de bandes formé par la $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$. La $\nu_{\text{L}}\text{OH}^-$ est également incluse dans la décomposition mathématique car elle se juxtapose à la $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$. Les données de la bibliographie ont servi de point de départ pour le positionnement de chaque bande existant dans la région spectrale $\nu_2\nu_4\text{PO}_4^{3-}$. Le Tableau 20 indique les données initiales entrées dans le logiciel de décomposition.

Tableau 20. Modèle initial utilisé pour décomposer le domaine d'absorption infrarouge 400 – 800 cm⁻¹ en huit bandes d'absorption distinctes, quel que soit le temps de maturation de l'ANB [Banu2005]

Attribution des bandes	Positions (cm ⁻¹)	Paramètre des bandes			
		Position	Largeur	Aire	Forme
$\nu_2\text{PO}_4^{3-}$	470	libre	fixée à 15 cm ⁻¹	fixée ≥ 0	Lorentzienne
HPO_4^{2-} non-apatitique	535	fixée à 535 cm ⁻¹	libre		
HPO_4^{2-} apatitique	550	fixée à 550 cm ⁻¹	fixée à 25 cm ⁻¹		
PO_4^{3-} apatitique	560	libre	libre		
PO_4^{3-} apatitique	575	libre	libre		
PO_4^{3-} apatitique	601	libre	libre		
PO_4^{3-} non-apatitique	617	fixée à 617 cm ⁻¹	libre		
OH apatitique	631	libre	libre		

Cette méthode de décomposition peut paraître hasardeuse, dans la mesure où 8 bandes coexistent. C'est pourquoi nous avons cherché à vérifier la reproductibilité et la justesse de la décomposition. Les paramètres libres (l'aire et la largeur de bande) mentionnés dans le Tableau 20 ont fait l'objet de différents essais (Tableau 21), pour chaque temps de maturation. Les différences entre les essais ont été choisies soit en évitant de diriger l'ajustement des bandes (essais n^o1 à 3), soit en les initialisant avec des valeurs proches des résultats obtenus dans la majorité des cas (essais n^o4 à 7). Quatre échantillons de chaque temps de maturation ont été décomposés selon les 7 essais. Afin de comparer les teneurs des différentes espèces ioniques en fonction des échantillons, l'intensité intégrée (= Aire) de chaque bande de décomposition est divisée par la somme des intensités intégrées des bandes qui constituent la $\nu_4\text{PO}_4$. Les intensités intégrées relatives de chaque bande ainsi calculées peuvent ensuite être comparées entre bandes d'un même spectre ou d'un autre.

Tableau 21. Variations des paramètres initiaux de décomposition IR (Aire ou « A » et Largeur ou « L »)

Positions (cm ⁻¹)	470		535		550		560 / 575 / 601		617		631	
	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L
Essais												
essai n ^o 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
essai n ^o 2	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5
essai n ^o 3	1	15*	5	25	5	25	6	18	5	25	5	25
essai n ^o 4 [#]	1	15*	5	25	5	25*	6	18	5	35	1	35
essai n ^o 5	1	15*	5	25	5	25*	6	18	5	35	5	35
Cas des maturations avec un épaulement à 631 cm⁻¹ (maturation 1 semaine)												
essai n ^o 6	1	15*	5	25	5	25*	6	18	1	15	5	35
Cas des maturations avec un fort épaulement à 631 cm⁻¹ (maturation 3 semaines)												
essai n ^o 7	1	15*	5	25	5	25*	6	18	0,5	6	8	33

*Paramètres fixés selon le Tableau 20

[#]Dans l'essai n^o4, les valeurs d'initialisation se rapprochent des valeurs approximatives finales.

Pour une même maturation courte (l'épaulement de la bande $\nu_{\text{L}}\text{OH}$ est inexistant ou imperceptible), quel que soit l'essai, la position de chaque bande reste identique (Tableau 22) et correspond aux données de la littérature (Tableau 18).

Tableau 22. Position (cm^{-1}) des bandes IR de la bande $\nu_4\text{PO}_4$, obtenues par décomposition mathématique des ANB maturées et d'une HA stœchiométrique

Attributions	ANB 20 min	ANB 3h	ANB 1jour	ANB 3jours	ANB 5jours	ANB 1 semaine	ANB 3semaines	HA stœchiométrique
HPO_4^{2-} non-ap	535	535	535	535	535	535	535	/
HPO_4^{2-} ap	550	550	550	550	550	550	550	550
PO_4^{3-} ap	561,8	561,2	561,6	562,3	562,2	562,3	563,1	566,1
PO_4^{3-} ap	572,9	574,6	574,3	572,5	573,6	572,2	574,6	573,6
PO_4^{3-} ap	602,5	601,8	602,1	603,1	602,7	602,9	602,9	602,2
PO_4^{3-} non-ap	617	617	617	617	617	617	617	/

Dans le cas où la bande $\nu_{\text{L}}\text{OH}$ est visible, les différents essais conduisent à 2 possibilités mathématiques pour lesquelles la différence majeure présentée dans le Tableau 23 concerne la bande $\nu_{\text{L}}\text{OH}$:

Tableau 23. Position et Aire associée de la bande $\nu_{\text{L}}\text{OH}$ dans le cas des 2 possibilités issues de la décomposition du massif de bandes $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$ des ANB maturées 1 et 3 semaines

Maturation	Essai	Position $\nu_{\text{L}}\text{OH}$	Aire $\nu_{\text{L}}\text{OH}$
1 semaine	n°6	629,2	15,4 %
	n°3	636,6	2,9 %
3 semaines	n°7	632,7	15,5 %
	n°3	635,0	3,8 %

Notons cependant que l'essai n°3 conduit systématiquement à une solution où la position de la bande $\nu_{\text{L}}\text{OH}$ est nettement décalée vers les hautes fréquences, ce qui ne semble pas avoir de signification physique par rapport aux données de la littérature. En revanche les essais n°6 et n°7, respectivement pour l'ANB maturée 1 semaine et 3 semaines, sont retenus pour aboutir à une solution de décomposition physiquement plausible, et en conformité avec la littérature.

→ Validation de la méthode de décomposition

Afin de contrôler l'efficacité de la méthode de décomposition, même dans le cas où certaines espèces ioniques sont inexistantes, les méthodes de décomposition citées dans le Tableau 21 ont été appliquées pour la décomposition de la bande $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$ de l'HA stœchiométrique. Comme indiqué sur la Figure 32A, bien que 8 bandes soient initialisées dans le logiciel de décomposition, l'affinement mathématique converge vers une situation qui élimine les contributions non-apatitiques. La Figure 32 présente également la décomposition mathématique d'une apatite maturée 1 semaine (B), cette dernière étant représentative du type de décomposition mathématique effectué sur l'ensemble des ANB étudiées.

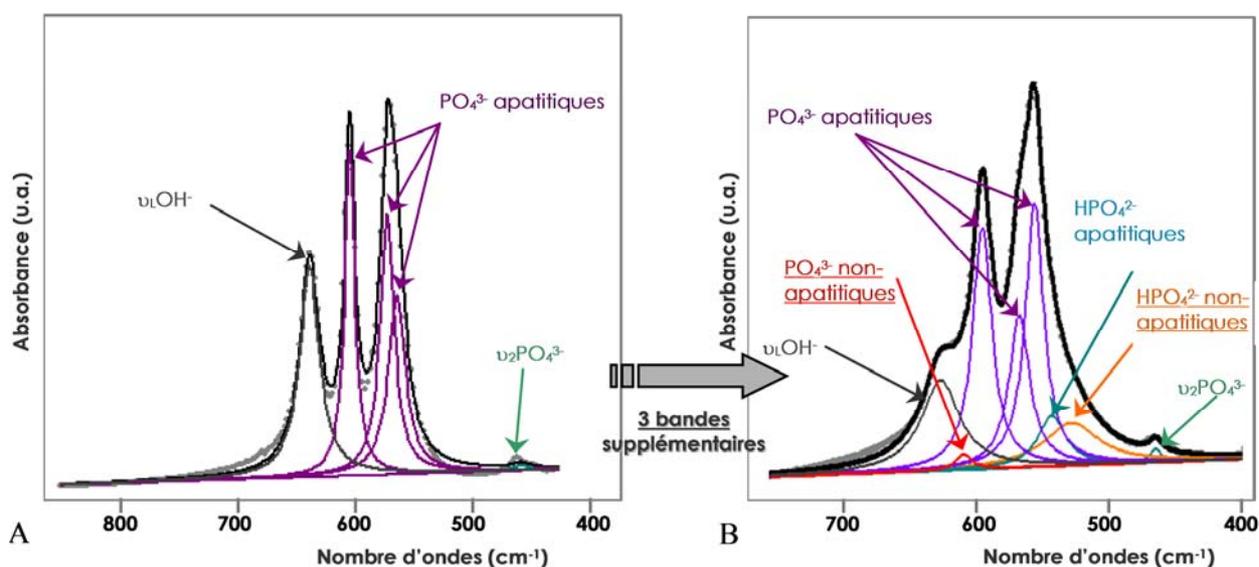


Figure 32. Décomposition FTIR dans le domaine spectral 800-400 cm^{-1} de l'hydroxyapatite stœchiométrique (A) et d'une ANB maturée 1 semaine (B)

Dans le cas de l'HA stœchiométrique (Figure 32A), le massif d'absorption IR peut être décomposé en 5 bandes relatives à des ions ayant un environnement apatitique : une pour le mode de vibration $\nu_1\text{OH}^-$, 3 pour le mode de vibration $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$, la dernière correspondant au mode $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$. En revanche, sur le spectre IR obtenu avec l'ANB, 3 bandes de vibration supplémentaires sont observées (Figure 32B). Ces bandes correspondent aux espèces ioniques HPO_4^{2-} (apatitiques et non-apatitiques), ainsi qu'aux ions PO_4^{3-} dans un environnement chimique non-apatitique [Rey1990]. Comme l'ont montré de précédentes études, ces environnements non-apatitiques (également présents pour diverses minéralisations biologiques) correspondent aux ions présents dans la couche hydratée [Cazalbou2004b].

→ Test statistique

Les résultats présentés correspondent à la moyenne des différentes valeurs de décompositions \pm l'écart-type. Pour évaluer l'évolution de la teneur en différentes espèces ioniques en fonction du temps de maturation, la loi de Fisher-Snedecor, qui permet de comparer au moins deux échantillons indépendants, a été utilisée (test ANOVA). Le niveau de différence significative est fixé pour $p > 0,05$.

→ Suivi de l'évolution des espèces ioniques en fonction du temps de maturation

Globalement, la Figure 33A montre une forte augmentation des ions hydroxyde, une légère diminution des ions hydrogénophosphate totaux (= apatitiques + non-apatitiques) et une diminution de l'ensemble des espèces non-apatitiques lorsque le temps de maturation est plus long. De façon plus détaillée, l'évolution des différentes espèces ioniques n'est pas régulière au cours de la maturation :

- Ions OH^- apatitiques

Au début de la maturation, les ions OH^- sont quasiment inexistantes. La formation de ces ions est significative à partir de 1 jour de maturation, puis se stabilise après 1 semaine. L'augmentation très importante de la teneur en ions OH^-_{ap} traduit le développement des domaines apatitiques.

- Ions HPO_4^{2-} totaux

Au début de la maturation (jusqu'à 1 jour), la quantité d'ions hydrogénophosphate totaux est stable (écarts non significativement différents), avec 4 fois plus d'ions HPO_4^{2-} dans la couche hydratée (espèces non-apatitiques) que dans le cœur apatitique (Figure 33B). En comparaison avec la teneur en début de maturation (ANB maturée 20 minutes), la teneur de ces ions est significativement plus faible à partir de 1 jour de maturation. De plus, avec le temps de maturation, la teneur en ions apatitiques augmente contrairement à celle en ions non-apatitiques ; l'écart entre les deux se resserre avec toujours une majorité d'ions HPO_4^{2-} dans la couche hydratée (Figure 33B).

La teneur élevée en ions HPO_4^{2-} , dans les ANB maturée 20 minutes et 3 heures, rappelle la teneur dans l'os jeune qui présente une faible cristallinité [Miller2001]. En effet, la teneur en ions HPO_4^{2-} et le taux de cristallinité sont inversement reliés [Miller2001].

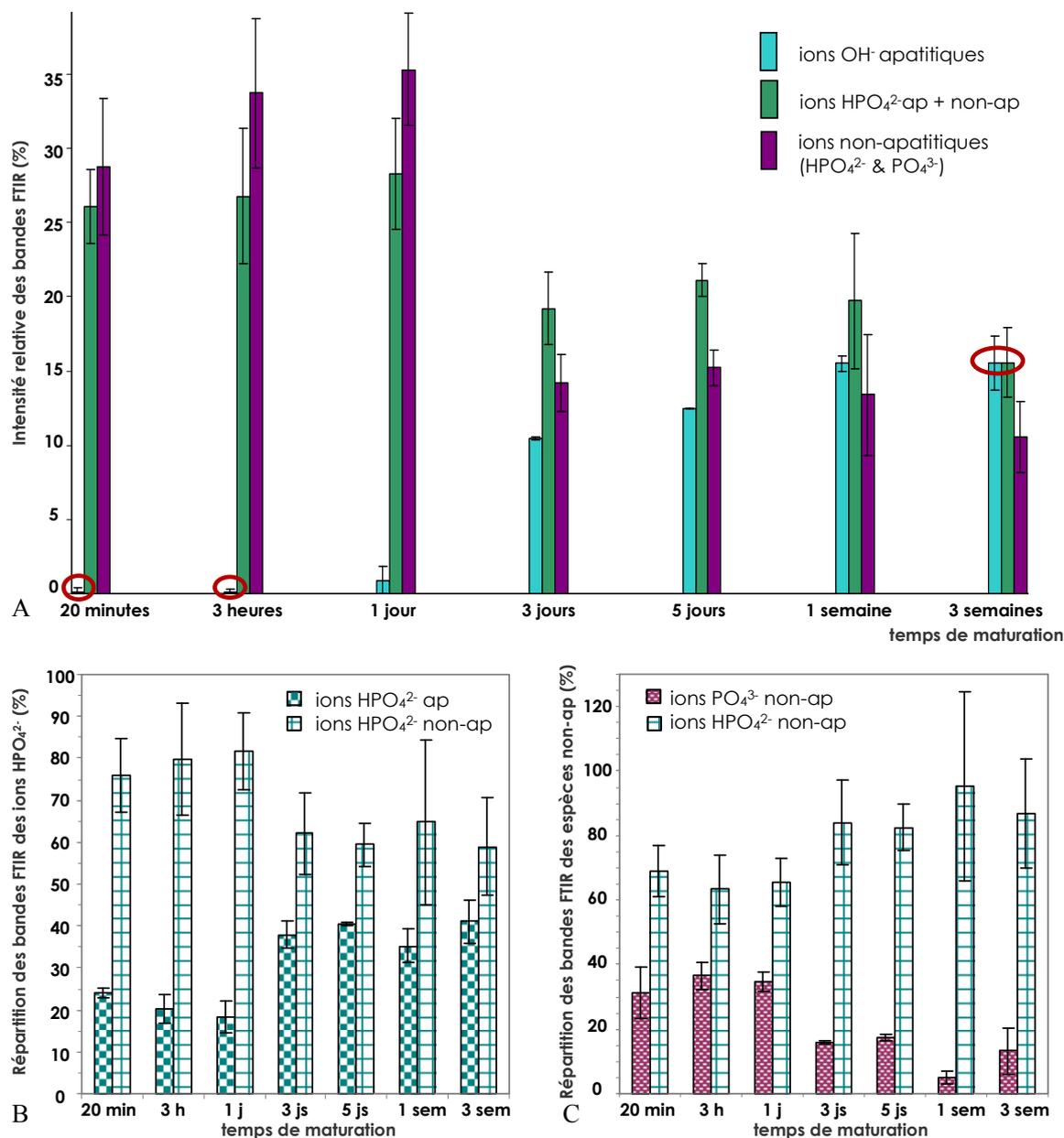


Figure 33. Suivi de l'évolution des espèces ioniques dans la couche hydratée et dans le cœur apatitique (A), de la répartition apatitique et non-apatitique des ions HPO_4^{2-} (B) et de la répartition des différentes espèces non-apatitiques (HPO_4^{2-} et PO_4^{3-}) dans les ANB (C), en fonction du temps de maturation

- Espèces chimiques non-apatitiques

Une légère augmentation des teneurs en espèces non-apatitiques semble être significative entre 20 minutes et 3 heures de maturation, avant de stagner jusqu'à 1 jour. La chute significative après 3 jours de maturation est due à la diminution importante de la teneur en ions PO_4^{3-} dans la couche hydratée, alors que la teneur en ions HPO_4^{2-} n'est pas significativement différente lorsque le temps de maturation augmente (Figure 33C). La diminution de la quantité d'espèces non-apatitiques avec le temps de maturation traduit une réduction de la proportion de la couche hydratée quand le temps de maturation augmente.

En comparant les proportions relatives des différentes espèces pour une même durée de maturation, notamment les ions hydroxyde et les ions hydrogénophosphate, il apparaît que les ions OH^- ont une intensité relative inférieure à celle des ions HPO_4^{2-} totaux, mais après 3 semaines de maturation, l'écart d'intensité IR entre les deux espèces est largement diminué.

L'évolution des teneurs relatives en ions OH^- et HPO_4^{2-} vient conforter les identifications de phases réalisées par DRX, après calcination des ANB maturées (§ II.3.1, Figure 25) : formation d'HA stœchiométrique après calcination de l'ANB maturée 3 semaines ; ainsi que l'évolution de la perte de masse Δm_3 obtenue par ATG (§ II.3.3, Figure 29) : perte infime avant 1 jour de maturation suivi d'une augmentation importante qui tend vers une limite après 1 semaine de maturation.

Nos ANB maturées sont comparables au minéral osseux pour les faibles temps de maturation (20 minutes et 3 heures), car contrairement à la dentine et à l'émail, l'os ne contient quasiment pas d'ions hydroxyde [Pasteris2004]. Les ions labiles, non-apatitiques, présents dans la couche hydratée des ANB ont un comportement similaire aux ions labiles présents dans le minéral osseux. Ainsi, la maturation des cristaux d'ANB s'apparente au vieillissement des cristaux du minéral osseux au cours duquel la disparition progressive des environnements non-apatitiques est associée au développement des environnements apatitiques stables [Cazalbou2004a]. Dans nos ANB maturées, les évolutions des différentes espèces ioniques sont rapides au début de la maturation. Elles tendent vers une stabilité plus grande avec le temps.

II.3.5. Les échanges ioniques

Les apatites possèdent plusieurs sites cristallographiques où les échanges ioniques peuvent avoir lieu, et où divers éléments avec des charges ioniques différentes peuvent s'adapter [Pan2002, Piccoli2002]. Comme nous l'avons précédemment expliqué dans le § I.1.5.b, dans le cas des apatites biologiques, ou des ANB, les cristaux possèdent de plus à leur surface une couche hydratée au sein de laquelle des ions, dits non-apatitiques (ions HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} ...), sont très mobiles et réactifs [Green1994, Cazalbou2000,2004a]. Ces ions labiles peuvent être facilement échangés au sein de la couche hydratée, de façon généralement réversible.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'échange des groupements HPO_4^{2-} non-apatitiques (dans la couche hydratée) par des ions CO_3^{2-} en vue vérifier la capacité d'échange ionique de la couche hydratée et son évolution lorsque le temps de maturation des ANB augmente. Si la décomposition mathématique des spectres IR confirme la diminution de la bande correspondant aux ions HPO_4^{2-} non-ap, alors les échanges ioniques nous permettrons de conforter les hypothèses de décomposition IR. En effet, en cherchant à évaluer la quantité maximale d'ions CO_3^{2-} pouvant être incorporés dans les ANB non carbonatées, en fonction de la maturation de l'apatite, Eichert [Eichert2001] a observé que l'incorporation de ces ions entraîne une diminution importante de la teneur en ions HPO_4^{2-} non-apatitiques.

Dans un second temps, nous avons cherché à échanger les ions Ca^{2+} de surface (non-apatitiques) par des ions Mg^{2+} afin de quantifier la proportion des ions calcium présents dans la couche hydratée et dans le cœur apatitique, au cours de la maturation.

II.3.5.a. Les échanges de surface HPO_4^{2-} / CO_3^{2-}

Les apatites biologiques [LeGeros1968] et les apatites carbonatées de synthèse [Rey1989] peuvent contenir des ions carbonate dans la couche hydratée (les ions CO_3^{2-} labiles) ainsi que dans deux sites cristallographiques : en site « phosphate », les ions CO_3^{2-} sont de type B, tandis que dans les tunnels formés par les ions calcium Ca II (§ I.1.4.e, Figure 7), les ions CO_3^{2-} de type A prennent la place des ions OH^- .

★ Protocole expérimental

→ Préparation des échantillons

Les poudres d'ANB utilisées pour les échanges ont été préparées précédemment selon la réaction de précipitation détaillée dans la PARTIE A. § II.1.1. Les 7 temps de maturation compris entre 20 minutes et 3 semaines ont été étudiés dans cette section. Afin d'optimiser le temps d'échange des ions HPO_4^{2-} non-apatitiques par les ions carbonate, sans modification significative de l'état de maturation de l'ANB, nous avons effectué les premiers essais avec une ANB dont le temps de maturation a été fixé à 24 heures, afin que la réaction d'échange ne soit pas masquée ou gênée par un processus de post-maturation. Hina a montré dans une précédente étude que la capacité d'échange diminuait considérablement lorsque la durée de maturation augmentait, mais à 24 heures, celle-ci est encore très importante [Hina1996]. De plus, les résultats de spectroscopie IR obtenus sur chaque ANB maturée (§ II.3.4.b) ont montré que l'évolution de la maturation est très rapide au début, mais ralentit après un jour. Le choix de l'ANB maturée 1 jour doit donc permettre d'évaluer le taux d'ions CO_3^{2-} incorporés après différentes durées d'échange plus courtes que le temps de maturation. Le cœur apatitique ne doit pas être modifié et la bande d'absorption $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ doit rester inchangée pour des courts temps d'échange. Une fois cette durée optimale déterminée pour l'ANB maturée 1 jour, ce temps sera appliqué à l'ensemble des ANB maturées.

→ Réalisation de l'échange

La poudre d'ANB maturée 1 jour ($m_{\text{ANB}} = 200 \text{ mg}$) est mise en suspension dans une solution aqueuse de NaHCO_3 (Merck, qualité pour analyses, pureté : 99,7 %) contenant des ions carbonate en large excès par rapport à la quantité de solide ($[\text{CO}_3^{2-}] = 1 \text{ mol.L}^{-1}$, $V = 50 \text{ mL}$). La suspension est sous agitation à température ambiante pendant toute la durée de l'échange, puis filtrée sur un fritté, lavée soigneusement avec 500 mL d'eau distillée, et enfin lyophilisée. Une fois sèche, la poudre ayant subi l'échange est placée au congélateur afin d'éviter toute altération avant d'être caractérisée. La spectroscopie IR est privilégiée pour suivre l'évolution et la quantification relative de l'incorporation des ions carbonate dans la structure des ANB.

→ Rappels bibliographiques

Le Tableau 24 rassemble les positions des bandes de vibration IR des ions carbonate dans différentes apatites carbonatées de synthèse ou biologiques. Notons que la bande d'absorption correspondant au domaine de la $\nu_1\text{CO}_3$ (à 950 cm^{-1} et 957 cm^{-1} respectivement pour les ions CO_3^{2-} type A [LeGeros1969] et type B [Barralet1995]) est difficilement observable car elle est masquée par la bande d'absorption ν_1 des ions phosphate à 960 cm^{-1} .

Tableau 24. Positions des pics d'absorption IR, identifiés dans les apatites nanocristallines carbonatées biologiques ou de synthèse, dans les régions spectrales ν_2 , ν_3 des ions carbonate, et leur attribution selon la littérature

Attributions	[LeGeros1968] ^b	[Vignoles1973] ^s	[Nelson1982] ^s	[Elhot1985] ^b	CO_3 type B [Rey1989] ^s	CO_3 type B [Rey1989] ^s	CO_3 type AB [Rey1989] ^{s & b}	[Feki1991] ^s
$\nu_4\text{CO}_3$			671 711 716 761					670 ^A 692 ^B 718 ^B 757 ^A
$\nu_2\text{CO}_3$	871 ^B 878*	871 ^B 878 ^A	873 ^B 878 ^A	878 ^A	878 ^A	866 ^m 871 ^B	866 ^m 871 ^B 878 ^A	
$\nu_3\text{CO}_3$		1420-1470 ^{B1} ou 1420-1460 ^{B2} 1465-1540 ^A ou 1465-1500 ^A	1415 1454 1469 1500		1463 ^A 1535 ^A	1422 ^B 1456 ^B	1416 ^{AB} 1452 ^{AB} 1470 ^{AB} 1500 ^{AB} 1545 ^{AB} 1568 ^{AB}	

s : apatite de synthèse b : apatite biologique A : CO_3 en site OH (type A) B : CO_3 en site PO_4 (type B)
 B1 : site PO_4 (type B) occupé par CO_3^{2-} + lacune d'oxygène B2 : site PO_4 (type B) occupé par CO_3^{2-} + OH^- m : CO_3 labile

*ne possèdent pas les caractéristiques cristallographiques et analytiques des CO_3 type A

Les bandes d'absorption IR ν_2 et ν_3 des ions carbonate (Figure 35) sont particulièrement intéressantes car elles sont clairement identifiables et leur combinaison « profil + position des bandes » renseigne sur le type de substitution (A, B ou labile). Cependant, seule la bande $\nu_2\text{CO}_3$, à notre connaissance, renseigne sur la présence des 3 types d'ions carbonate : CO_3^{2-} labile à 866 cm^{-1} , CO_3^{2-} type B à 871 cm^{-1} (substitution des groupes PO_4) et CO_3^{2-} type A à 878 cm^{-1} (substitution des groupes OH^-) (Tableau 24).

Dans un premier temps, nous avons déterminé la position de la bande $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ afin d'identifier après combien de temps les ions HPO_4^{2-} non-apatitiques cessaient d'être échangés, et où d'autres ions apatitiques commençaient à être échangés. Initialement positionnée vers 866 cm^{-1} , la bande $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ se décalera d'autant plus vers les plus grands nombres d'ondes que des ions apatitiques, (OH^-) seront échangés (Figure 34).

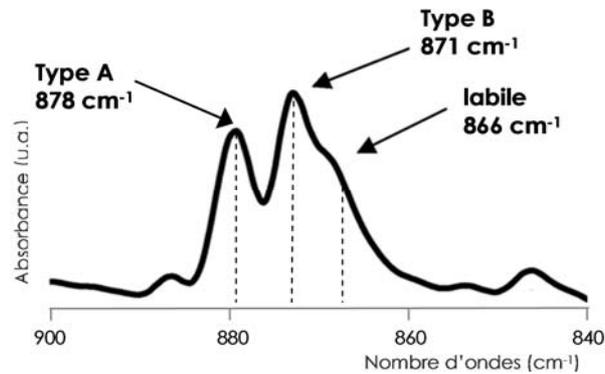


Figure 34. Détails de la bande d'absorption $\nu_2\text{CO}_3$ dans une apatite carbonatée

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la bande $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ pour suivre l'évolution de l'incorporation des ions carbonate dans l'ANB, en fonction du temps d'échange. Pour cela, le rapport des intensités intégrées (= Aire) des bandes d'absorption $\nu_3\text{CO}_3^{2-} / \nu_3\text{PO}_4^{3-}$ a été calculé comme illustré sur la Figure 35, en considérant que l'intensité intégrée de la bande $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ reste inchangée pendant les échanges car la post-maturation de l'ANB est négligeable.

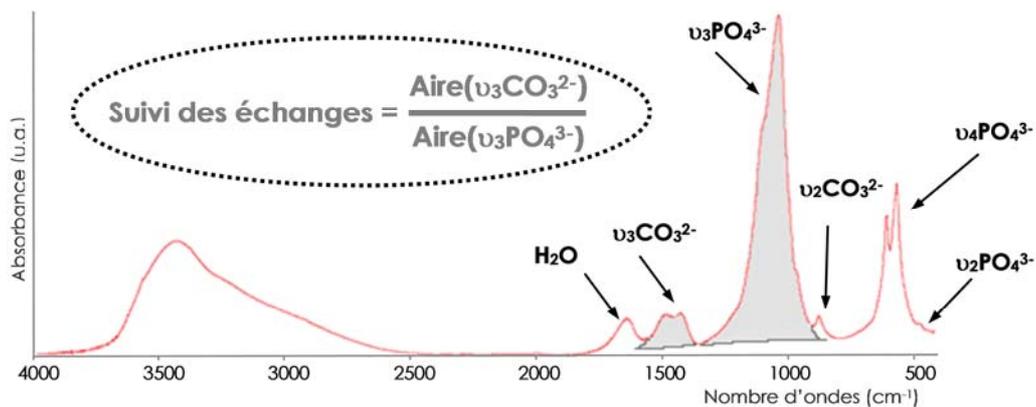


Figure 35. Spectre d'absorption IR d'une ANB maturée 1 jour, après échange de 20 minutes dans une solution carbonatée

→ Optimisation de l'échange des ions HPO_4^{2-} non-apatitiques sur l'ANB maturée 1 jour

L'évolution des échanges ioniques a été suivie par spectroscopie FTIR, sur un spectromètre Perkin Elmer spectrum one. Tous les spectres ont été analysés sous forme de poudre dispersée dans une pastille de bromure de potassium (KBr) entre 4000 et 400 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de scans de 64. Les spectres ont été acquis avec une absorbance maximale de l'ordre de $1 \pm 0,2$.

Des échanges ont été réalisés entre 1 minute (la poudre versée dans la solution de carbonate sous agitation est immédiatement filtrée et lavée) et 1 jour. Sur la Figure 36B, la bande de vibration $\nu_2\text{CO}_3$ se décale progressivement vers les plus grands nombres d'ondes lorsque le temps d'échange de l'ANB maturée 1 jour augmente dans la solution carbonatée. Après 4 heures d'échange, la bande $\nu_2\text{CO}_3$ se positionne au-delà de 873 cm^{-1} . Cela suggère que des ions CO_3^{2-} type A ont commencé à être échangés. Effectivement, la position des ions OH^- (substitution type A) dans les tunnels (formés par les Ca II), dans la structure apatite, les rend plus accessibles que les ions phosphate apatitiques (substitution type B). Ainsi les ions OH^- sont préférentiellement échangés après les ions HPO_4^{2-} non-apatitiques.

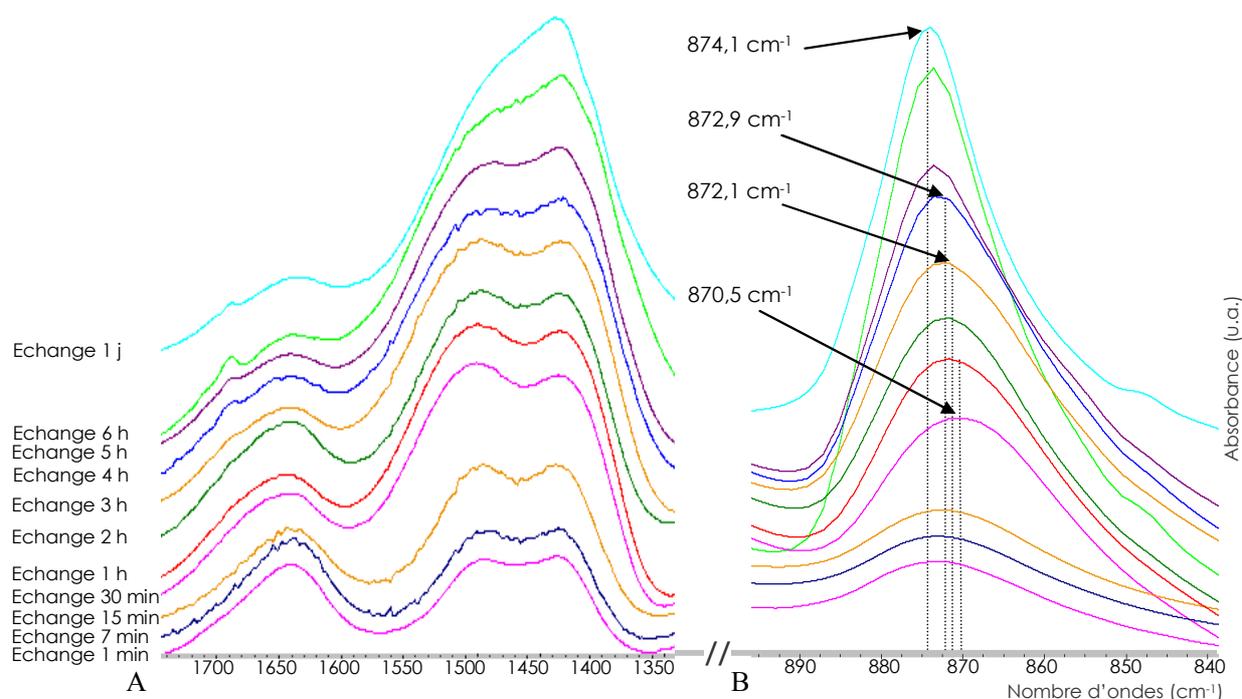


Figure 36. Domaines spectraux $\nu_3\text{CO}_3$ (A) et $\nu_2\text{CO}_3$ (B), de l'ANB maturée 1 jour, en fonction du temps de contact avec la solution d'ions carbonate

De plus le profil de la bande de vibration $\nu_3\text{CO}_3$ (Figure 36A) se modifie à partir de 4 heures d'échange ionique. Concernant la bande $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$, deux pics à 1430 cm^{-1} et 1482 cm^{-1} sont visibles sur la Figure 36A quel que soit le temps d'échange, mais celui à 1482 cm^{-1} s'estompe en ne formant plus qu'un épaulement au pic à 1430 cm^{-1} . Cette modification apparaît clairement après 5 heures d'échange.

La quantité relative d'ions carbonate incorporés dans la structure correspond au rapport des intensités intégrées des bandes $\nu_3\text{CO}_3$ sur $\nu_1\nu_3\text{PO}_4$ comme le montre la Figure 35. La Figure 37A permet de suivre l'évolution de l'incorporation des ions CO_3^{2-} en fonction du temps d'échange dans l'ANB maturée 1 jour.

Il est possible de distinguer 3 périodes d'échange. Pendant la première heure (zone I), l'incorporation est très rapide. Les ions échangés pendant cette période sont des espèces non-apatitiques. Au cours de la période n°II, entre 1 heure et 4 heures d'échange, peu d'espèces sont échangées, un équilibre d'échange a été atteint. Ensuite, au cours de la période n°III la quantité d'ions échangés croît brutalement. Les ions échangés dans cette seconde zone d'échange sont des espèces apatitiques plus difficilement échangeables que les ions non-apatitiques.

Nous avons vu sur la Figure 36A que le profil de la bande $\nu_3\text{CO}_3$ se modifiait après 5h, accompagné d'un décalage vers les plus grands nombres d'ondes de la $\nu_2\text{CO}_3$, suggérant l'échange d'autres ions. Souhaitant échanger uniquement des ions HPO_4^{2-} non-apatitiques, un temps d'échange maximal de 3 heures a été fixé comme durée maximale d'échange. Ce temps a été appliqué à l'ensemble des ANB maturées.

→ Teneur relative des espèces ioniques dans les ANB maturées, après échange de 3h dans la solution carbonatée

Lorsque le temps de maturation augmente la quantité relative d'ions incorporés diminue, ce qui est cohérent avec la diminution de la teneur en espèces non-apatitiques échangeables lorsque la maturation de l'ANB est plus importante (Figure 33). Pour l'échange ionique avec les ANB maturées au-delà de 3 jours, la diminution de la quantité relative d'ions incorporés est plus lente, ce qui corrobore l'évolution des espèces non-apatitiques dans la couche hydratée, en fonction du temps de maturation.

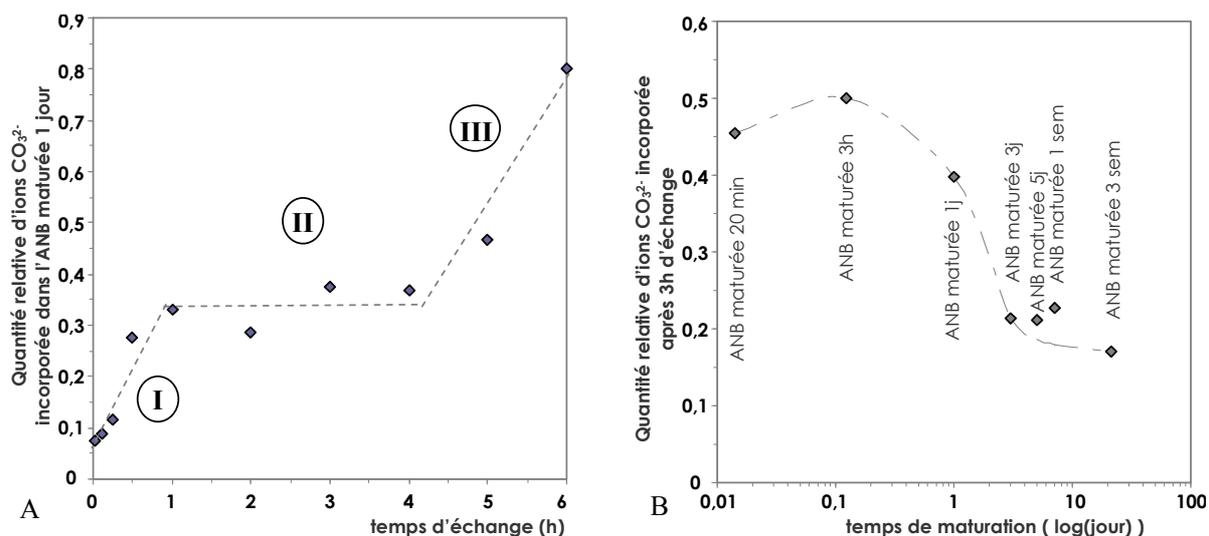


Figure 37. *Quantité relative d'ions carbonate incorporés dans l'ANB maturée 1 jour après différents temps d'échange (A), dans chaque ANB maturée, immergée pendant 3h dans la solution d'échange(B)*

Afin de vérifier l'échange des ions HPO_4^{2-} non-apatitiques, présents dans la couche hydratée (Figure 38A), ainsi que le non-échange des ions OH^- apatitiques (Figure 38B), la bande d'absorption $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$ a été décomposée mathématiquement de la même façon que précédemment (§ II.3.4.b). L'intensité (= Aire) de chaque bande de décomposition est divisée par la somme des intensités des bandes qui constituent la $\nu_4\text{PO}_4$ afin de comparer les teneurs des différentes espèces ioniques d'un même échantillon ou d'un autre.

Quelle que soit l'ANB maturée :

→ les ions OH^- paraissent être concernés, mais de façon limitée, par la substitution avec les ions CO_3^{2-} après 3 heures d'échange ;

→ la teneur en ions HPO_4^{2-} non-apatitiques est inférieure après échange, néanmoins tous les ions HPO_4^{2-} non-apatitiques n'ont pas été échangés.

La proportion d'ions échangés diminue lorsque l'ANB est maturée plus longtemps. Dans le cas par exemple de l'ANB maturée 20 minutes, la teneur en ions HPO_4^{2-} non-ap était de 20 % avant l'échange. Elle a chuté à 5,5 % après l'échange. Ainsi 73 % de la teneur relative en ions HPO_4^{2-} non-ap présent dans l'ANB avant échange, ont été échangés. Dans le cas de l'ANB maturée 3 semaines, seulement 50 % des ions HPO_4^{2-} non-ap ont été échangés.

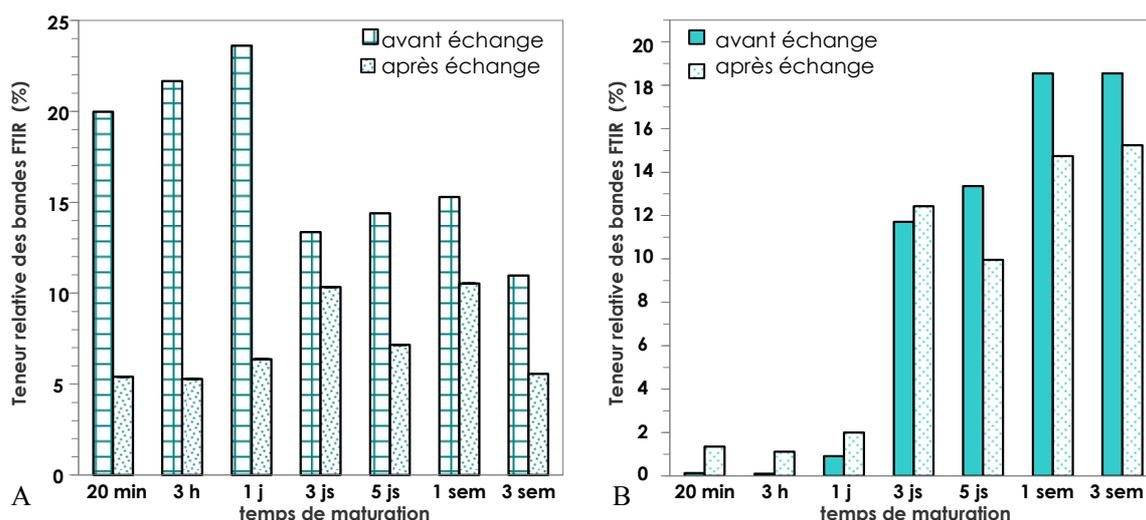


Figure 38. Suivi des espèces ioniques HPO_4^{2-} non-apatitiques (A) et OH^+ apatitiques (B) avant et après échange de 3h dans la solution carbonatée

→ Affinement de la position des bandes vibrationnelles FTIR dans le domaine spectral $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$

Bien que tous les ions HPO_4^{2-} non-ap n'aient été échangés, le profil de la bande $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$ est modifié. En effet, la bande de vibration (à $\approx 535 \text{ cm}^{-1}$) qui correspond aux ions HPO_4^{2-} non-ap, située à l'extrémité du massif de bandes du côté des petits nombres d'ondes, est diminuée d'intensité. Si des ions OH^- ont commencé à être échangés, seul l'épaule (à $\approx 632 \text{ cm}^{-1}$) du massif de bande $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$ du côté opposé à la bande des ions HPO_4^{2-} non-ap sera affectée. Les autres bandes d'absorption qui constituent le massif de bande $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$, n'ont pas été affectées de façon significative pendant les échanges ioniques.

Les échanges ioniques effectués pour chaque ANB maturée ont ainsi mené à une variation du profil de la région spectrale $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$. La connaissance de la teneur des différentes espèces ioniques avant l'échange, et la position des différentes bandes dans le massif de la $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$, nous a permis d'affiner la position FTIR de chaque bande après l'échange ionique (Tableau 25).

Les paramètres initialement fixés, selon la méthodologie décrite plus haut, ont été libérés. Les positions de bande définies pour chaque espèce ionique, dans le massif $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$, sont très peu différentes des hypothèses de décomposition utilisées au début de ce travail. De plus, les positions évoluent légèrement en fonction de l'état de maturation de l'ANB. Elles sont en

accord avec les données de la littérature pour les apatites nanocristallines mentionnées dans le Tableau 18.

Tableau 25. Position (cm^{-1}) des bandes vibrationnelles, obtenues par décomposition mathématique du massif $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$, dans les ANB mûries après échange ionique

Attributions	ANB 20min	ANB 3h	ANB 1jour	ANB 3jours	ANB 5jours	ANB 1semaine	ANB 3semaines
HPO_4^{2-} non-ap	527,8	526,8	526,2	533,1	531,8	531,1	530,9
HPO_4^{2-} ap	549,3	547,2	544,6	551,5	552,3	552,5	551,8
PO_4^{3-} ap	560,9	560,8	560,6	562,0	562,3	562,3	562,6
PO_4^{3-} ap	576,2	576,6	576,9	573,7	573,6	573,9	574,0
PO_4^{3-} ap	601,6	601,4	601,8	601,9	602,1	601,7	601,7
PO_4^{3-} non-ap	612,4	612,0	614,6	610,6	611,6	609,7	608,6

Les échanges d'ions HPO_4^{2-} non-apatitiques contre des ions CO_3^{2-} ont mis en évidence la réactivité de surface des ANB. Elle diminue lorsque le temps de maturation des ANB croît.

Les résultats de décomposition après échange nous ont permis de valider la position des bandes, ainsi que les teneurs relatives des différents environnements phosphate dans chaque ANB mûrie (sans échange ionique).

II.3.5.b. L'échange des ions calcium Ca^{2+}

Dans cette section, le but est de faire la distinction entre les ions Ca^{2+} présents dans la couche hydratée, de ceux appartenant aux domaines apatitiques. De ce fait, l'idée est de réaliser des échanges uniquement avec les ions calcium mobiles de la couche hydratée, sans modifier le cœur apatitique. Etant donné que seuls les ions dans un environnement non-apatitique peuvent être échangés (rapidement), et que la surface de la couche hydratée diminue au cours de la maturation, la quantité d'ions échangeables diminue avec le temps de maturation [Cazalbou2005]. Néanmoins tous les ions présents dans la couche hydratée ne sont pas forcément échangés. La réversibilité de l'échange et l'impact sur l'avancement de la maturation sont fonctions de la nature de l'ion qui vient se substituer à l'ion calcium [Cazalbou2000,2005] : si cet ion reste dans la couche hydratée, c'est-à-dire qu'il ne peut que difficilement entrer dans le domaine apatitique (cas de l'ion Mg^{2+}), il peut être rééchangé et

peut stabiliser parfois l'évolution de la couche hydratée. Au contraire, si cet ion peut aisément entrer dans le domaine apatitique (cas de l'ion Sr^{2+}), il ne gêne pas significativement le vieillissement des cristaux, mais il ne peut plus être échangé. D'autre part, le choix du magnésium comme cation échangeur est motivé par le fait qu'il s'agit d'un élément essentiel à considérer lors d'études d'analogues au minéral osseux car en plus d'être indispensable à la vie, le corps des vertébrés contient en moyenne 25 g de magnésium dont 65 % sont situés dans les os [Pasteur1861, Raulin1870, Canals1920].

★ **Protocole expérimental**

Dans de précédents travaux, Cazalbou a mis en évidence la rapidité de tels échanges de surface : l'équilibre est atteint en quelques minutes à température ambiante [Cazalbou2005]. Le mode opératoire est similaire à celui utilisé dans le cas des ions carbonate.

La poudre d'ANB est mise en suspension dans une solution aqueuse de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, qualité pour analyses, pureté : 99,0 %) contenant des ions Mg^{2+} en large excès par rapport à la quantité de solide ($[\text{Mg}^{2+}] = 1 \text{ mol.L}^{-1}$, $V = 50 \text{ mL}$). La suspension est sous agitation à température ambiante pendant toute la durée de l'échange, puis filtrée sur un fritté, lavée soigneusement avec 500 mL d'eau distillée, et enfin lyophilisée. Une fois sèche, la poudre ayant subi l'échange est placée au congélateur afin d'éviter toute altération avant d'être caractérisée. Le suivi de l'échange ne peut être réalisé par dosage en retour avec l'EDTA, car celui-ci se complexe indifféremment avec les ions calcium et magnésium. Les dosages des cations sont ainsi réalisés par ICP/AES. L'erreur relative sur la détermination de la teneur en alcalino-terreux est de l'ordre de 5 % (soit 10 fois supérieure à l'erreur du dosage par EDTA), c'est pourquoi un dosage des ions calcium a également été réalisé avant échange ionique, pour comparaison.

→ Optimisation de l'échange des ions Ca^{2+} non-apatitiques sur l'ANB maturée 1 jour, et application aux autres ANB

Afin d'optimiser l'échange des ions Ca^{2+} non-apatitiques, nous avons procédé de la même façon que pour l'étude de l'échange avec les ions carbonate. Des échanges ont été réalisés entre 20 minutes et 1 heure avec l'ANB maturée 1 jour. La Figure 39A met en évidence l'équilibre d'échange atteint après 30 minutes d'immersion de l'ANB maturée 1 jour dans la solution contenant le magnésium. Cette durée d'échange est ensuite appliquée à chaque

maturation. Les Figure 39B et C montrent que la quantité d'ions calcium échangeables (dosés par ICP/AES) diminue avec l'allongement du temps de maturation de l'ANB. Dans une ANB maturée 20 minutes, 91,7 % des ions calcium ne sont pas échangeables, alors que dans l'ANB maturée 3 semaines, la teneur en ions calcium non échangeables s'élève à 96,4 %. Ces ions non échangeables sont stables dans la structure apatitique.

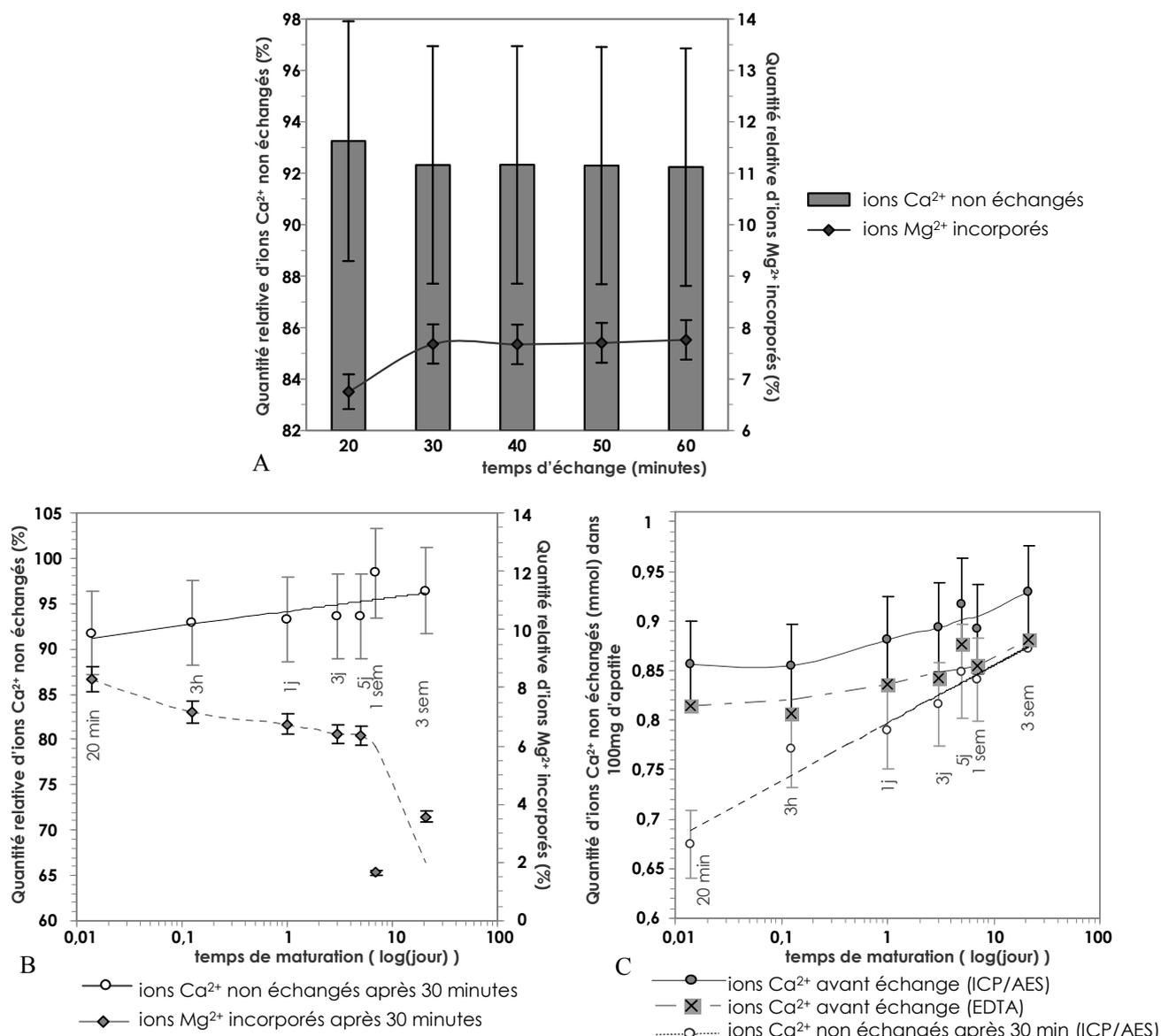


Figure 39. Quantité relative d'ions calcium non échangeables, et d'ions magnésium incorporés dans une ANB maturée 1 jour, en fonction du temps d'échange (A), échange pendant 30 minutes des ions Ca^{2+} par des ions Mg^{2+} pour chaque ANB maturée (B), et comparaison des deux techniques de dosage (analyse par ICP-AEP et dosage retour par EDTA) (C)

Sur la Figure 39C, un écart constant de 4 % est visible entre la quantité d'ions Ca^{2+} dosés avant échange par volumétrie en retour (EDTA) et par ICP/AES (valeur inférieure). Il serait logique de considérer le dosage par volumétrie en retour comme étant le plus fiable car les précédents résultats ont été confirmés notamment par la diffraction X. De plus, l'erreur sur la mesure est 10 fois plus importante par ICP/AES. Ainsi, il est raisonnable de penser que les dosages par analyse ICP/AES sont légèrement (4 %) sous évalués.

Les valeurs de la teneur totale en ions Ca^{2+} dosés par volumétrie en retour sont utilisées pour estimer, en première approximation, les proportions d'ions Ca^{2+} présents dans la couche hydratée (les ions Ca^{2+} échangés par des ions Mg^{2+}), et ceux présents dans le cœur apatitique (Figure 40). La Figure 40 illustre l'augmentation de la quantité d'ions calcium apatitiques au détriment des ions Ca^{2+} non-apatitiques présents.

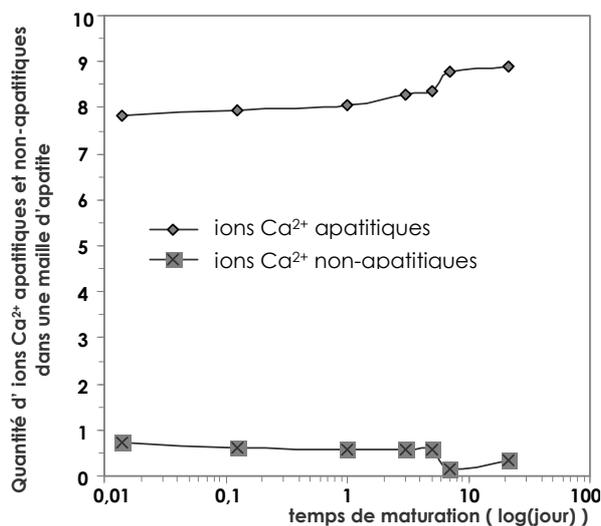


Figure 40. Quantité d'ions calcium apatitiques et non-apatitiques dans une maille d'apatite contenant 6 atomes de phosphore

Ces évolutions corroborent la réorganisation progressive des ions de la couche hydratée lorsque le temps de maturation augmente ; l'ANB tendant progressivement vers la stabilité. Ces résultats confortent les données recueillies par spectroscopie FTIR.

II.3.6. La spectroscopie vibrationnelle Raman

Les spectroscopies vibrationnelles IR et Raman sont complémentaires. Elles donnent des informations détaillées sur les vibrations moléculaires, sur l'environnement moléculaire et dans une certaine mesure sur l'état de cristallinité des échantillons.

En spectrométrie Raman, l'analyse se fait par excitation du matériau. Porté à un niveau énergétique virtuel par une puissante source lumineuse monochromatique de type laser, le matériau émet ensuite une radiation qui est collectée puis analysée par un détecteur adéquat. Cette radiation comporte deux types de signaux. Le premier très majoritaire correspond à la diffusion Rayleigh (radiation incidente diffusée élastiquement sans changement d'énergie, donc sans variation de longueur d'onde). Toutefois, quelques photons restreints peuvent interagir avec la matière qui absorbe (ou cède) de l'énergie aux photons incidents produisant ainsi les radiations Stokes (ou anti-Stokes). La variation d'énergie observée sur le photon nous renseigne alors sur les niveaux énergétiques de rotation et de vibration de la molécule concernée.

L'activité vibrationnelle est différemment perçue en spectroscopie Raman et infrarouge : certaines bandes sont actives à la fois en Raman et en IR, d'autres le sont uniquement en IR ou en Raman. Un mode normal de vibration sera actif en IR si le mouvement correspondant s'accompagne d'une variation du moment dipolaire électrique de la molécule. Un mode normal de vibration sera actif en Raman si le mouvement correspondant s'accompagne d'une variation de la polarisabilité de la molécule.

Contrairement à la spectroscopie IR, la spectroscopie Raman ne demande aucune préparation de l'échantillon, elle permet une analyse directe et non-destructive de celui-ci.

II.3.6.a. Rappels bibliographiques

Trois régions spectrales peuvent être identifiées sur le spectre Raman de l'hydroxyapatite phosphocalcique [Penel1997,1998], entre 650-400 cm^{-1} , entre 1100-900 cm^{-1} et entre 3510-3650 cm^{-1} . Dans les apatites, la présence des ions phosphate avec différents types d'environnements (apatitique et non-apatitique) affecte les modes de vibration en spectroscopie Raman, de même qu'en spectroscopie IR [Trombe1973], même s'ils sont plus

difficiles à observer [Penel1998]. Le Tableau 26 indique les modes de vibration des groupements phosphate (PO_4 et HPO_4) visibles en spectroscopie Raman.

Tableau 26. Positions des bandes de vibration des groupements phosphate, visibles par spectroscopie Raman, et leur attribution selon la littérature

Attributions	[Klee1970] ^{HA}	[Nelson1982] ^{HA}	[Penel1997,1998] ^{HA}	[Pasteris2004] ^{HA}	[Markovic2004] ^{HA SRM}	[Antonakos2007] ^{HAc}	[Awonusi2007] ^{HAc}	[Eichert2007] ^{HA}	[Penel1998] ^{émail}	[Penel1998] ^{dentine}	[Penel1998] ^{os}	[Pasteris2004] ^{os}	[Eichert2007] ^{ANB}
$\nu_2\text{PO}_4$	429 446 451		432 449		431 447	431 446 561	430 449	433 448	433 450	432 450	432 452		432 452
$\nu_4\text{PO}_4$	580 591 606 615	580 593 608 615	581 592 608 614		579 590 607 614	579 592 610	581 590 609	580 591 607 614	579 588 608	580 590 610	584 590 611		584 590 611
P—OH de HPO_4					880					873	873		873
espèce non- ap ?										920	924		
$\nu_1\text{PO}_4$	963		964	962,2	962	963	960	964	959	959	961	960	961
$\nu_1\text{HPO}_4$					1005				1002	1003	1005		1005
$\nu_3\text{PO}_4$	1033 1040	1028 1039 1045	1029 1034 1042 1048	1047	1028.5 1040 1047	1032	1029 1040 1047	1029 1034 1041	1026 1043	1031 1046	1032 1044	NC	1032 1044
	1051 1059 1078	1053 1061 1075	1057 1064 1077	1076	1052 1076	1052	1053 1061 1076	1057 1064 1077	1071	1069	1071	1072	1071

NC : position non-communiquée HA_c : hydroxyapatite carbonatée

HA_{SRM} : Standard Reference Material (contient des HPO_4^{2-} et de CO_3^{2-}) [McDowell1977]

La bande à 1003 cm^{-1} , observée pour la première fois par Penel et al. [Penel1998] dans les apatites biologiques, a été attribuée au mode ν_1 des ions HPO_4^{2-} , car cette bande est également présente sur les spectres d'apatite cristallisée contenant des ions HPO_4^{2-} [Markovic2004], de phosphates de calcium autres qu'apatitiques tel l'OCP [Fowler1993], du minéral biologique [Sauer1994] ; et elle est absente sur les spectres d'apatites carbonatées de synthèse, obtenues dans des conditions alcalines [Penel1998]. La bande à 873 cm^{-1} ou à 880 cm^{-1} visible respectivement sur les spectres Raman des apatites biologiques [Penel1998] et de l'HA

contenant des ions HPO_4^{2-} [Markovic2004] est attribuée au mode d'élongation de la liaison P—OH de l'ion HPO_4^{2-} .

Néanmoins, la détection des espèces ioniques HPO_4^{2-} est plus difficile par spectroscopie Raman que par IR [Penel1998].

La bande de vibration $\nu_1\text{PO}_4$ est la bande la plus intense sur le spectre Raman de l'HA stœchiométrique [Ou-Yang2000], de plus elle est sensible aux changements d'environnement des ions phosphate [Penel1998], et à l'état de cristallinité de l'ANB [Zou2005]. C'est pourquoi, dans ce travail, nous avons étudié cette bande afin de suivre l'influence de la maturation sur le profil spectral de la bande $\nu_1\text{PO}_4$ en spectroscopie Raman.

II.3.6.b. Résultats

Les spectres Raman sont enregistrés dans le domaine $350\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ sur un spectromètre Labraham HR 800 de chez Horiba Jobin Yvon. Les spectres sont acquis à température ambiante, avec un temps d'exposition de 90 s (3 accumulations) pour une longueur d'onde excitatrice de 514,532 nm (avec une puissance de 280 mW au niveau de l'échantillon). La résolution du spectre est de 2 cm^{-1} . Un objectif de microscope, avec un grossissement $\times 100$, a été utilisé dans une configuration confocale, ce qui donne une taille de spot micrométrique ($200\text{ }\mu\text{m}$).

Afin de pouvoir comparer les spectres entre eux, ceux-ci sont moyennés, c'est-à-dire que chaque valeur d'intensité Raman est divisée par la moyenne de l'ensemble des intensités constituant le spectre Raman, ce qui permet une normalisation.

Quel que soit le temps de maturation de l'ANB, le mode de vibration ν_1 des phosphates à 962 cm^{-1} (Figure 41) montre un épaulement du côté des plus faibles fréquences, vers $955\text{ - }959\text{ cm}^{-1}$.

La flèche sur le spectre indique la réduction de l'épaulement, simultanément au décalage de la position de la $\nu_1\text{PO}_4$ vers les plus hautes fréquences, lorsque le temps de maturation augmente. Au contraire, du côté des plus hautes fréquences, le profil des spectres est identique, ils se rejoignent la ligne de base au même endroit. Selon la littérature, l'épaulement correspondrait à la présence des ions PO_4^{3-} non-apatitiques [Rey1995].

Cette région spectrale a été décomposée afin de suivre l'évolution des espèces non-apatitiques au cours de la maturation. Contrairement à la méthode de décomposition effectuée en spectroscopie FTIR (dans la région spectrale des bandes $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$, qui comprenait 8 bandes juxtaposées) ; en spectroscopie Raman, la bande $\nu_1\text{PO}_4$ à décomposer ne contient plus que deux contributions. Afin de ne pas négliger le pied de la bande, la région à décomposer a été étendue entre 800 et 1100 cm^{-1} (Tableau 27). La Figure 42 illustre la décomposition mathématique de la bande $\nu_1\text{PO}_4$ ainsi que les bandes voisines de plus faible intensité prises en compte.

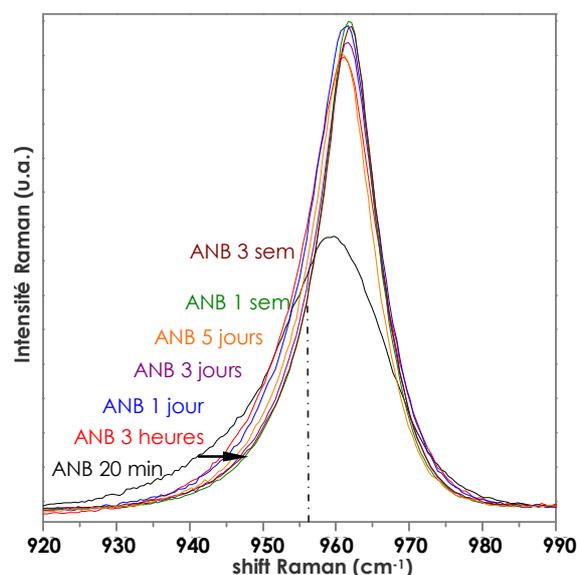


Figure 41. Spectres Raman dans la région du mode de vibration $\nu_1\text{PO}_4$ en fonction du temps de maturation de l'ANB

Tableau 27. Position des bandes de décomposition dans le domaine spectral entre 800 et 1100 cm^{-1} , et leur attribution selon la littérature (Tableau 26)

Attribution		Position (cm^{-1})	forme
P—OH de HPO_4		880,4	Gauss-Lorentzienne
?		904,1	
$\nu_1\text{PO}_4$	PO_4^{3-} non-ap [Rey1995]	953,0	
	PO_4^{3-} ap	961,7	
$\nu_1\text{HPO}_4$ non-ap [Rey1995]		1003,2	
$\nu_3\text{PO}_4$		1030,1	
		1046,5	
		1077,5	

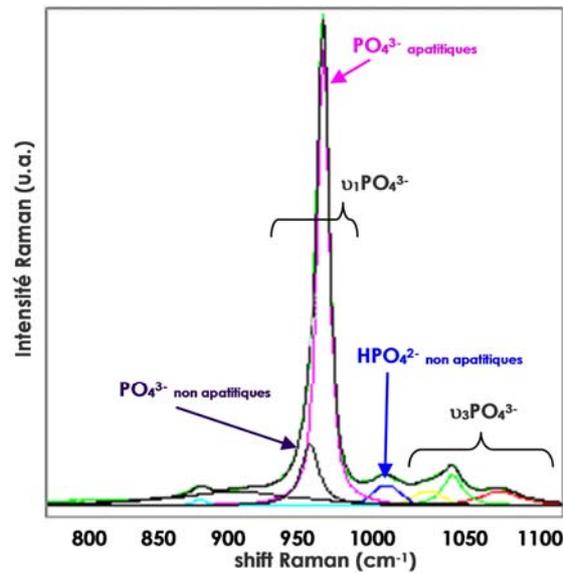


Figure 42. Décomposition mathématique du spectre Raman de la bande $\nu_1\text{PO}_4$, pour une ANB maturée 3 jours

Afin de suivre l'évolution des espèces non-apatitiques, au cours de la maturation, le rapport des intensités intégrées est calculé pour chaque temps de maturation. L'histogramme sur la Figure 43 montre une diminution de la teneur en ions PO_4^{3-} non-apatitiques lorsque le temps de maturation s'allonge, ce qui est en accord avec les résultats de décomposition de la bande $\nu_2\nu_4\text{PO}_4$ en FTIR (Figure 33C). Cela confirme par ailleurs la diminution progressive de la couche hydratée avec la maturation des ANB.

D'autre part, plusieurs auteurs se rejoignent sur le fait qu'en Raman, la position et la largeur de la bande $\nu_1\text{PO}_4$ renseignent sur l'état de cristallinité du matériau [Sauer1994, Choo-Smith2005, Zou2005]. Sur la Figure 43, la largeur à mi-hauteur (FWHM) de la bande Raman $\nu_1\text{PO}_4$ est directement liée à la contribution de l'épaule attribué aux ions PO_4^{3-} non-apatitiques : La FWHM diminue proportionnellement avec la diminution de la teneur en ions PO_4^{3-} non-apatitiques lorsque le temps de maturation augmente.

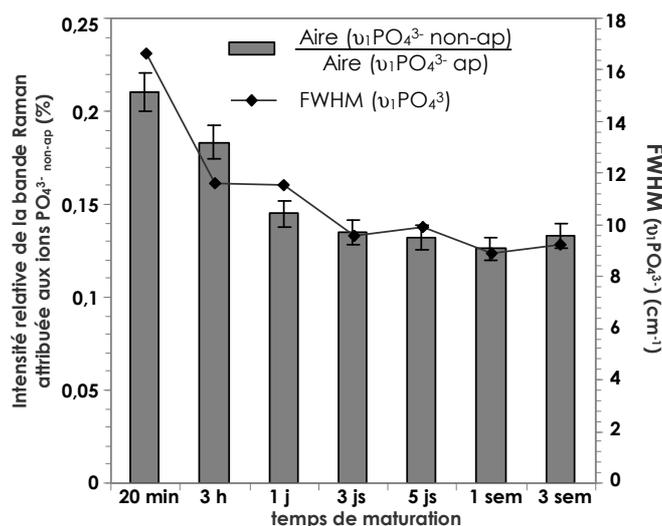


Figure 43. Suivi de l'évolution des espèces non-apatitiques (histogramme) et corrélation avec la FWHM de la bande $\nu_1\text{PO}_4$ (courbe), au cours de la maturation des ANB

De plus, le Tableau 28 indique que la bande $\nu_1\text{PO}_4$ se déplace vers les plus hauts nombres d'ondes, et tend vers la position dans l'hydroxyapatite stœchiométrique bien cristallisée (Tableau 26). Ce déplacement traduit une amélioration de la cristallinité [Choo-Smith2005]. D'autre part, Zou et al. ont mis en évidence une relation entre l'état de cristallinité d'une apatite substituée, la taille des cristallites et la FWHM de la bande $\nu_1\text{PO}_4$ en spectroscopie Raman [Zou2005]. La diminution de la FWHM de la bande $\nu_1\text{PO}_4$ avec l'augmentation du temps de maturation rappelle l'évolution de la FWHM de la raie de diffraction X (310) montrée précédemment (Figure 21B, § II.3.1). Cette diminution de FWHM (de la raie (310) et de la bande $\nu_1\text{PO}_4$) indique une augmentation de la taille des cristallites, et ainsi une amélioration de l'état cristallin des ANB lorsque le temps de maturation est plus long.

Tableau 28. Position de la bande $\nu_1\text{PO}_4$ en fonction du temps de maturation

ANB maturée	20 min	3heures	1 jour	3 jours	5 jours	1semaine	3 semaines
Position $\nu_1\text{PO}_4$ (cm ⁻¹)	959,9	961,2	961,4	961,7	961,7	961,9	962,0

Ainsi, à la fois le profil et la position de la bande $\nu_1\text{PO}_4$ indiquent que le temps de maturation de l'ANB permet d'améliorer l'état cristallin du matériau : les données obtenues par spectroscopie Raman peuvent donc corroborer les résultats de DRX qui mentionnent une augmentation de la taille des cristallites.

Il serait également possible par la suite, de suivre l'évolution de la $\nu_s\text{OH}$ en fonction de la contribution des ions PO_4^{3-} apatitiques dans la bande $\nu_1\text{PO}_4$. En effet, les molécules d'eau diffusent très peu en Raman, contrairement à l'IR. Ainsi le mode d'élongation de la liaison O—H ($\nu_s\text{OH}$) à 3573 cm^{-1} est bien distinct et spécifique au composé. Parmi les apatites biologiques, le minéral osseux est l'ANB la plus éloignée de la stœchiométrie, et le pic de la $\nu_s\text{OH}$ n'est pas détecté, alors que des pics d'intensité faible et forte sont respectivement identifiés sur les spectres Raman de la dentine et de l'émail dentaire [Pasteris2004]. Lorsque le pic de la $\nu_s\text{OH}$ est présent sur le spectre des ANB biologiques, une corrélation existe entre la concentration du groupe hydroxyde (= rapport des aires des pics $\nu_s\text{OH} / \nu_1\text{PO}_4$), le degré d'ordre atomique (largeur relative du pic de la $\nu_1\text{PO}_4$) et la taille des cristallites. Pasteris et al. émet la théorie suivant laquelle plus la taille des cristallites est petite et plus le désordre atomique est grand au sein de la maille élémentaire du cristal, moins il est énergétiquement favorable pour l'apatite d'incorporer les ions OH^- dans les sites formés par les tunnels délimités par les CaII [Pasteris2004]. Etant donné que l'étude du désordre cristallin nous a montré qu'il était important dans les ANB mûrées, et que les données de décomposition IR indiquent que la teneur en ions OH^- est quasi-nulle pour une maturation inférieure à 3 heures, puis augmente avec le temps de maturation, une étude complémentaire en spectroscopie Raman dans le domaine de la $\nu_s\text{OH}$ pourrait permettre de les isoler et de croiser les résultats physico-chimiques relatifs à la cristallinité des ANB mûrées.

D'autres informations pourraient être également accessibles à partir du spectre Raman, telle la variation de position des pics sur le profil témoignant de variations de composition du matériau [Pasteris2004]. Nous n'avons pas, dans ce travail, disposé du temps nécessaire pour développer davantage l'étude par spectroscopie Raman ; et ceci pourrait faire l'objet de travaux ultérieurs.

II.4. Etude thermodynamique d'apatites nanocristallines par calorimétrie de chute (*drop solution calorimetry*)

Les précédentes caractérisations physico-chimiques ont montré, en accord avec les travaux antérieurs, que les apatites nanocristallines avaient tendance à évoluer naturellement, lorsqu'elles étaient laissées en milieu humide, vers une composition chimique plus proche de la stœchiométrie et vers un meilleur état de cristallinité. Des études antérieures réalisées au CIRIMAT (non publiées) ont montrées la mise en place d'un traitement « interruptif » de type lyophilisation était nécessaire pour conserver les phases apatitiques avec un état de maturation donné. Cette métastabilité a donc été observée, à ce stade, de façon « indirecte », et nous avons alors souhaité quantifier l'effet thermodynamique relié au phénomène de maturation par des déterminations d'enthalpies de formation (sur une base expérimentale) pour des apatites correspondant à un état de maturation croissant.

Ce travail, par calorimétrie de chute, a été effectué lors d'un séjour de 2 mois au sein du Peter A. Rock Thermochemistry Laboratory de UC Davis, dans le groupe du Professeur A. Navrotsky.

II.4.1. Le principe de la calorimétrie de chute (ou *drop calorimetry*)

La calorimétrie de chute [Navrotsky1997] est réalisée sur un calorimètre double Tian-Calvet illustré par la Figure 44, dont la technologie a été élaborée par le Professeur Navrotsky. Il est composé de deux compartiments à échantillon jumeaux, chacun entouré d'une thermopile qui est encastrée dans un bloc métallique. Les deux thermopiles sont reliées en opposition, chaque compartiment à échantillon agit comme une référence pour l'autre, comme des réactions chimiques qui ont lieu alternativement, d'un côté, puis de l'autre [Navrotsky2000].

Le but de la calorimétrie de chute est la transformation des réactifs et des produits en éléments dans le même état physique final, soit une solution diluée des ions dissouts dans un bain d'oxydes. Contrairement à la calorimétrie de chute en voie sèche pour laquelle l'échantillon

est préalablement équilibré à la température du calorimètre avant d'être introduit, lors de la calorimétrie de chute en milieu oxydes fondus, l'échantillon est directement introduit à température ambiante (298 K) (sous forme de pastille de 5 mg) via le tube du calorimètre (Figure 44), dans 20 à 30 g de solvant oxyde fondu (molybdate de sodium $3 \text{ Na}_2\text{O}, 4 \text{ MoO}_3$) à 973 K (Figure 44B). Au cours de l'expérience, un flux d'air circule au-dessus du solvant en fusion ($\approx 80 \text{ mL/min}$) afin d'éliminer rapidement les gaz éventuellement produits (par exemple $\text{H}_2\text{O}, \text{CO}_2 \dots$). Le gaz bulleur (Figure 44B) est utilisé en fonction des échantillons testés ($\approx 6 \text{ mL/min}$), pour améliorer le mélange des oxydes dissouts dans le solvant, en aidant leur dissolution, et pour contrôler l'état d'oxydation [Putnam1999].

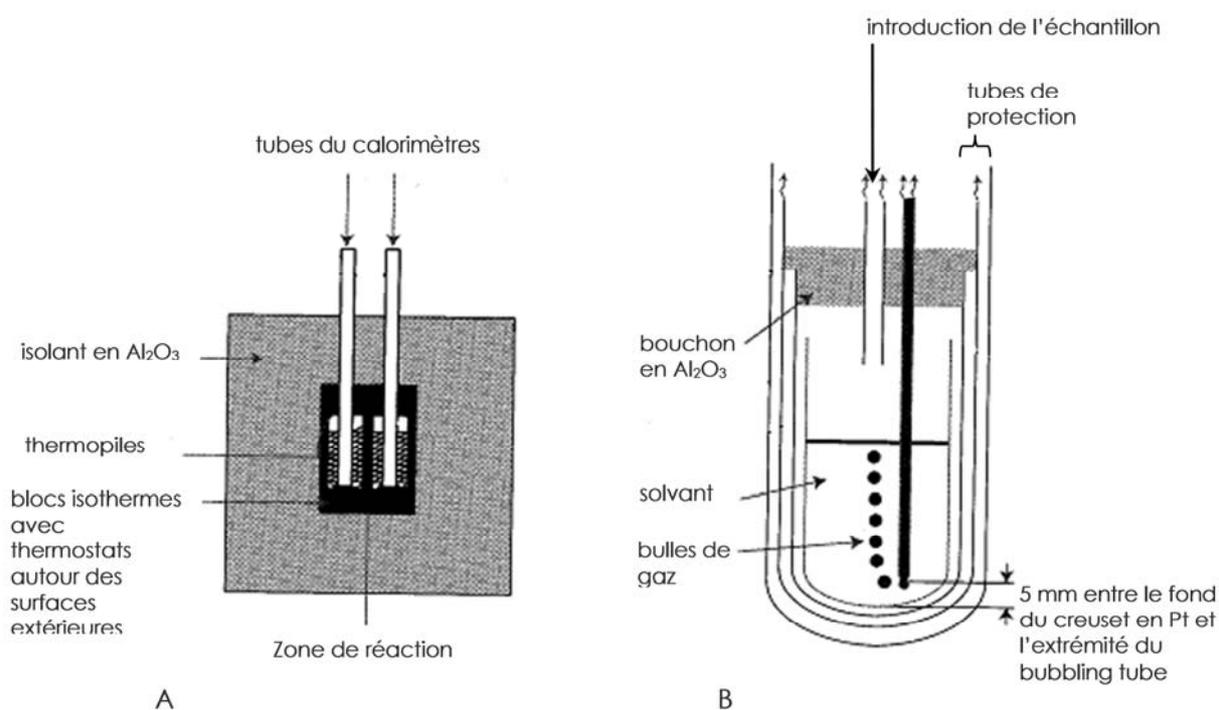


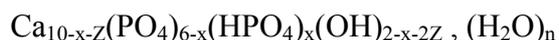
Figure 44. Géométrie du calorimètre de chute (A) et détail d'un tube de calorimètre (B)
[Putnam1999]

Les pastilles sont introduites alternativement dans l'un puis l'autre tube d'insertion jusqu'à saturation du solvant. Le temps de dissolution est inférieur à 1h, quel que soit l'échantillon. La réaction de dissolution est considérée comme finie lorsque la ligne de base revient à sa valeur initiale (retour à la ligne de base).

II.4.2. Les échantillons testés

Nous avons ici mené des expériences de calorimétrie de chute dans le molybdate de sodium afin de déterminer l'enthalpie standard de formation ΔH_f° d'apatites maturées pendant 20 minutes, 3 heures, 1 jour, 3 jours, 5 jours, 1 semaine et 3 semaines. La composition chimique (déterminée à l'issue des caractérisations physico-chimiques) des apatites nanocristallines utilisées dans cette étude thermodynamique est reportée sur le Tableau 17, page 90. Nous avons également employé deux échantillons de référence : l'hydroxyapatite stœchiométrique (HA) et le phosphate tricalcique bêta (β -TCP).

Rappelons la formule chimique des ANB :



avec "n" correspondant à l'eau restant après lyophilisation.

La détermination des enthalpies de formation ΔH_f° de ces composés à partir des enthalpies de chute mesurées expérimentalement nécessite l'application d'un cycle thermodynamique. Le cycle utilisé ici est reporté sur le Tableau 29. Notons que la valeur de $\Delta H_{ds}(\text{P}_2\text{O}_5)$ est la seule à ne pas avoir été déterminée directement ici compte tenu de la difficulté à manipuler P_2O_5 ; l'obtention de cette valeur avait fait l'objet d'un travail antérieur au sein du Peter A. Rock Thermochemistry laboratory [Ushakov2001].

Les valeurs expérimentales des enthalpies de chute ΔH_{ds} , et ΔH_f° déterminées à l'aide de ce cycle sont rassemblées dans le Tableau 30. Les enthalpies de formation déterminées pour les deux composés de référence β -TCP ($-4090,2 \pm 10,6$ kJ/mol) et HA stœchiométrique ($-13431,0 \pm 22,7$ kJ/mol) sont également indiquées. Ces deux valeurs sont en bon accord (à $\approx 0,7$ % près) avec les valeurs reportées dans la littérature ($-4120,8 \pm 5,0$ kJ/mol et $-13477,0 \pm 10,0$ kJ/mol respectivement [Robie1995]), validant ainsi ces mesures.

Tableau 29. Cycle thermodynamique utilisé pour la détermination de ΔH_f° pour les apatites nanocristallines préparées

Réactions	ΔH
(1) $\text{Ca}_{10-x-z}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x-2z}(\text{H}_2\text{O})_n \rightarrow (10-x-z) \text{CaO (soln, 973)} + 3 \text{P}_2\text{O}_5 \text{ (soln, 973)} + (1-Z+n) \text{H}_2\text{O (g, 973)}$	$\Delta H_{\text{ds}}(\text{apatite hydratée})$
(2) $\text{CaCO}_3 \text{ (s, 298)} \rightarrow \text{CaO (soln, 973)} + \text{CO}_2 \text{ (g, 973)}$	$\Delta H_{\text{ds}}(\text{CaCO}_3)$
(3) $\text{Ca (s, 298)} + \text{C (s, 298)} + 3/2 \text{O}_2 \text{ (g, 298)} \rightarrow \text{CaCO}_3 \text{ (s, 298)}$	$\Delta H_f^\circ(\text{CaCO}_3)$
(4) $\text{CO}_2 \text{ (g, 298)} \rightarrow \text{CO}_2 \text{ (g, 973)}$	$\Delta H_{\text{hc}}(\text{CO}_2 \text{ (g)})$
(5) $\text{C (s, 298)} + \text{O}_2 \text{ (g, 298)} \rightarrow \text{CO}_2 \text{ (g, 298)}$	$\Delta H_f^\circ(\text{CO}_2 \text{ (g)})$
(6) $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ (s, 298)} \rightarrow \text{P}_2\text{O}_5 \text{ (soln, 973)}$	$\Delta H_{\text{ds}}(\text{P}_2\text{O}_5)$
(7) $2 \text{P (s, 298)} + 5/2 \text{O}_2 \text{ (g, 298)} \rightarrow \text{P}_2\text{O}_5 \text{ (s, 298)}$	$\Delta H_f^\circ(\text{P}_2\text{O}_5)$
(8) $\text{H}_2\text{O (g, 298)} \rightarrow \text{H}_2\text{O (g, 973)}$	$\Delta H_{\text{hc}}(\text{H}_2\text{O(g)})$
(9) $\text{H}_2 \text{ (g, 298)} + 1/2 \text{O}_2 \text{ (g, 298)} \rightarrow \text{H}_2\text{O (g, 298)}$	$\Delta H_f^\circ(\text{H}_2\text{O(g)})$
Formation d'apatite nanocristalline (hydratée) :	
(10) $(10-x-z) \text{Ca (s, 298)} + 6 \text{P (s, 298)} + (1-Z+n) \text{H}_2 \text{ (g, 298)} + (26-x-2Z+n)/2 \text{O}_2 \text{ (g, 298)} \rightarrow \text{Ca}_{10-x-z}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x-2z}(\text{H}_2\text{O})_n$	$\Delta H_f^\circ \text{ (apatite hydratée)}$
$\Delta H_f^\circ \text{ (apatite hydratée)} = -\Delta H_1 + (10-x-z) \Delta H_2 + (10-x-z) \Delta H_3 - (10-x-z) \Delta H_4 - (10-x-z) \Delta H_5 + 3 \Delta H_6 + 3 \Delta H_7$ $+ (1-Z+n) \Delta H_8 + (1-Z+n) \Delta H_9 \equiv \Delta H_f^\circ \text{ (apatite)} + n \Delta H_f^\circ(\text{H}_2\text{O(l)})$	
d'où, pour l'apatite anhydre :	
$\Delta H_f^\circ \text{ (apatite)} = -\Delta H_1 + (10-x-z) \Delta H_2 + (10-x-z) \Delta H_3 - (10-x-z) \Delta H_4 - (10-x-z) \Delta H_5 + 3 \Delta H_6 + 3 \Delta H_7 + (1-Z+n) \Delta H_8$ $+ (1-Z+n) \Delta H_9 - n \Delta H_f^\circ(\text{H}_2\text{O(l)})$	

Dans ce tableau, nous avons reporté, d'une part, l'enthalpie de formation du composé lyophilisé tel qu'il a été utilisé dans les expériences de calorimétrie (comportant une quantité « n » de molécules d'eau) notée « $\Delta H_f^\circ(\text{apatite hydratée})$ », et d'autre part, l'enthalpie de formation de l'apatite nanocristalline dépourvue de l'eau d'hydratation (celle-ci pouvant généralement s'apparenter d'un point de vue thermodynamique à de l'eau liquide), notée « $\Delta H_f^\circ(\text{apatite})$ ». Comme on peut le constater, lorsque le temps de maturation augmente, cette dernière devient de plus en plus négative (exothermique), se rapprochant ainsi progressivement de la valeur de l'enthalpie de formation de l'hydroxyapatite stœchiométrique.

Tableau 30. Valeurs expérimentales de ΔH_{ds} et valeurs déterminées pour ΔH_f° pour diverses apatites et composés de référence

Echantillons	ΔH_{ds} (kJ/mol)	ΔH_f° (composé) (kJ/mol)	
Composés de référence :			
β -TCP	$267,3 \pm 9,7$ (6)	$-4090,2 \pm 10,6$	
HA stœchiométrique	$1027,7 \pm 21,4$ (11)	$-13431,0 \pm 22,7$	
Echantillons	ΔH_{ds}	ΔH_f° (apatite hydratée)* (kJ/mol)	ΔH_f° (apatite) (kJ/mol)
Apatites nanocristallines :			
20 min	$1197,7 \pm 10,0$ (10)	$-13756,8 \pm 12,2$	$-12058,9 \pm 12,2$
3 h	$1198,2 \pm 15,0$ (9)	$-13370,7 \pm 16,5$	$-12174,9 \pm 16,5$
1 jour	$1241,7 \pm 9,5$ (8)	$-13393,4 \pm 11,8$	$-12364,4 \pm 11,8$
3 jours	$1088,6 \pm 9,1$ (9)	$-13352,3 \pm 11,5$	$-12342,1 \pm 11,5$
5 jours	$1077,4 \pm 5,1$ (9)	$-13373,3 \pm 8,7$	$-12457,0 \pm 8,7$
1 semaine	$1137,2 \pm 9,1$ (10)	$-13362,2 \pm 11,5$	$-12546,1 \pm 11,5$
3 semaines	$1172,8 \pm 20,2$ (9)	$-13708,7 \pm 21,4$	$-12771,0 \pm 21,4$

* incluant les "n" molécules d'eau associées à la poudre d'apatite lyophilisée

La Figure 45 reporte sous forme graphique l'évolution de ΔH_f° (apatite) en fonction du temps de maturation, mettant en évidence une décroissance monotone (de type décroissance exponentielle en première approximation), et un rapprochement vers la valeur de l'HA stœchiométrique.

Cette étude permet ainsi, pour la première fois à notre connaissance, d'évaluer les enthalpies standards de formation d'apatites biomimétiques, et de suivre leur évolution en fonction de leur état de maturité.

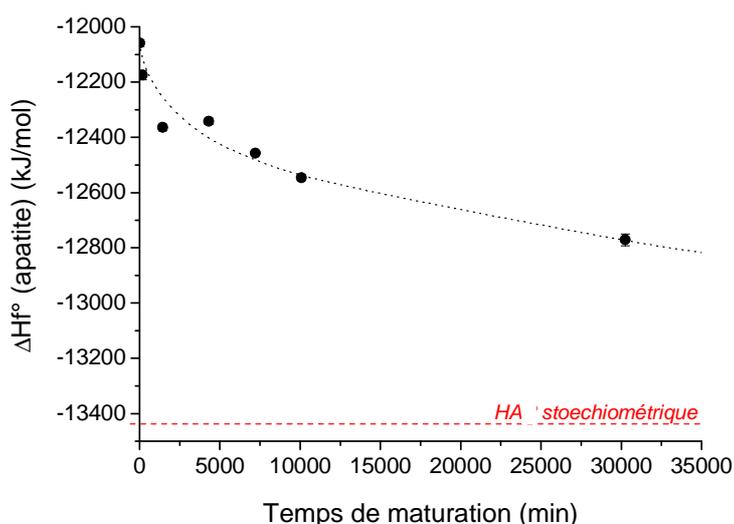


Figure 45. Evolution de l'enthalpie de formation ΔH_f° (apatite) d'apatites nanocristallines maturées entre 20 min. et 3 semaines

Les valeurs d'entropie pour de telles apatites nanocristallines non-stœchiométriques ne sont pas accessibles dans la littérature, où seules sont reportées des données portant sur des hydroxy-, fluor- et chlor-apatites stœchiométriques [Jemal1995,2004, Ben Cherifa2004] (Tableau 31).

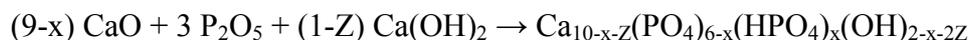
Tableau 31. Données thermodynamiques de la littérature [Jemal1995,2004, Ben Cherifa2004] sur des hydroxy-, fluor- et chlor-apatites stœchiométriques

Composés	ΔG_f° (kJ/mol)	ΔH_f° (kJ/mol)	ΔS_f° (kJ/mol.K)
hydroxyapatites			
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	-12 674	- 13 477	- 2,69
Sr ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	-12 587	- 13 373	- 2,64
Pb ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	- 7 482	- 8 261	- 2,61
Cd ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	- 7 873	- 8 652	- 2,61
Ba ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	- 12 553	- 13 309	- 2,54
fluoroapatites			
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	-12 781	- 13 558	- 2,61
Cd ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	- 8 045	- 8 795	- 2,52
Sr ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	- 12 845	- 13 604	- 2,55
Pb ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	- 7 782	- 8 529	- 2,51
Ba ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	- 12 834	- 13 564	- 2,45
chloroapatites			
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ Cl ₂	-12 418	- 13 180	- 2,56
Cd ₁₀ (PO ₄) ₆ Cl ₂	- 7 719	- 8 463	- 2,50
Sr ₁₀ (PO ₄) ₆ Cl ₂	- 12 478	- 13 233	- 2,53
Pb ₁₀ (PO ₄) ₆ Cl ₂	- 7 458	- 8 220	- 2,56
Ba ₁₀ (PO ₄) ₆ Cl ₂	- 12 418	- 13 246	- 2,78

On peut cependant relever que pour l'ensemble de ces composés stœchiométriques, la composante enthalpique de l'énergie libre de formation (ΔG_f°) est largement prédominante par rapport à la composante entropique. Dans ces conditions, la stabilité relative des phases en question peut être déduite, avec une approximation satisfaisante, à partir des valeurs relatives des enthalpies de formation ΔH_f° (Figure 45). Dans ce contexte, la plus forte exothermie de l'enthalpie de formation des apatites nanocristallines observée en fonction du temps de maturation permet de mettre en évidence une stabilité thermodynamique des phases apatitiques d'autant plus grande que les phases sont mûries.

Il est néanmoins intéressant de tenter d'estimer l'entropie des apatites nanocristallines préparées dans ce travail. Une telle estimation est généralement rendue possible par la considération d'une réaction (même hypothétique) faisant intervenir uniquement des phases solides. En effet, dans ce cas la variation d'entropie de réaction $\Delta S^\circ_{\text{réact}}$ est généralement

négligeable (très faible variation de volume de réaction). Nous pouvons par exemple considérer la réaction :



L'application de $\Delta S^\circ_{\text{réact}} = 0$ pour l'HA stœchiométrique ($x = Z = 0$) mène alors à l'entropie absolue $S^\circ(\text{HA stœchiométrique}) \approx 769,5 \text{ J}/(\text{mol.K})$. Cette valeur présente un bon accord (à 1,5 % près) par rapport à la valeur $780,8 \text{ J}/(\text{mol.K})$ reportée dans la littérature [Robie1995]. L'entropie absolue S° relative à chaque apatite nanocristalline a alors été évaluée de façon similaire (Tableau 32) ; les valeurs de S° ainsi estimées varient entre 695 et 737 $\text{J}/(\text{mol.K})$, avec une incertitude d'environ 20 $\text{J}/(\text{mol.K})$. A partir de ces valeurs, les entropies standard de formation ΔS_f° (à partir des éléments pris dans leur état standard) ont également été évaluées et reportées dans le Tableau 32.

Tableau 32. Estimation des valeurs de S° et ΔS_f° pour les apatites nanocristallines maturées entre 20 minutes et 3 semaines, et pour l'HA stœchiométrique

Echantillon	à 298 K			
	S° estimé J/(mol.K) [$\pm 20 \text{ J}/(\text{mol.K})$]	ΔS_f° estimé J/(mol.K) [$\pm 20 \text{ J}/(\text{mol.K})$]	Rappel de ΔH_f° kJ/mol	ΔG_f° estimé kJ/mol
Apatites nanocristallines				
20 min	695,2	-2 469	-12 058,9 \pm 12,2	-11 323,1 \pm 12,2
3 h	694,6	-2 467	-12 174,9 \pm 16,5	-11 439,7 \pm 16,5
1 jour	706,6	-2 512	-12 364,4 \pm 11,8	-11 616,0 \pm 11,8
3 jours	708,2	-2 507	-12 342,1 \pm 11,5	-11 595,0 \pm 11,5
5 jours	722,9	-2 565	-12 457,0 \pm 8,7	-11 692,6 \pm 8,7
1 semaine	721,4	-2 558	-12 546,1 \pm 11,5	-11 783,9 \pm 11,5
3 semaines	736,5	-2 607	-12 771,0 \pm 21,4	-11 994,2 \pm 21,4
Composé de référence				
HA stœchiométrique	769,5	-2 704	-13 477 \pm 10	-12 674,2 \pm 10

A partir de la connaissance des enthalpies de formation ΔH_f° et de ces estimations de ΔS_f° , il est alors possible d'évaluer l'énergie libre de formation ΔG_f° de ces composés, et les valeurs obtenues sont également indiquées dans le Tableau 32. Comme on peut le voir, là encore, la composante enthalpique de l'énergie libre est largement majoritaire par rapport à la composante entropique, et comme attendu ΔG_f° devient de plus en plus exothermique (négative) lorsque le temps de maturation augmente, ce qui confirme nos précédentes conclusions indiquant la stabilité croissante de ces apatites avec leur état de maturation (se rapprochant progressivement de l'HA stœchiométrique).

Connaissant ces valeurs de ΔG_f° , il serait alors intéressant d'estimer la variation d'énergie libre $\Delta G_{f \text{ maturation}(i \rightarrow f)}^\circ$, en solution, entre un état de maturation initial « i » et un état final « f » correspondant à une maturation plus avancée. En effet, s'il est crucial de connaître l'enthalpie ou l'énergie libre de formation des ANB, il est également nécessaire de prendre en compte les données thermodynamiques correspondant aux ions aqueux qui sont incorporés ou libérés pendant le processus de maturation afin d'avoir une vision globale de l'évolution de ces phases en milieu humide. Cette tâche est cependant plus ardue qu'il n'y paraît à prime abord. En effet, le processus de maturation est un phénomène très complexe mettant probablement en jeu, en plus d'une évolution de composition chimique vers la stœchiométrie, diverses réactions secondaires comme des réactions de dissolution-reprécipitation, des réactions de surface, et l'évolution de la distribution des ions à l'interface entre la couche hydratée et le domaine apatitique sous-jacent. De plus, compte-tenu de l'existence de cette couche hydratée « non-apatitique », la composition chimique mesurée pour l'état « initial » et l'état « final » ne peut que correspondre à une moyenne sur l'ensemble du cristal et ne rend pas compte de l'existence de deux types de sous-domaines (apatitique au cœur et non-apatitique en surface) pouvant présenter des caractéristiques thermodynamiques différentes.

Si l'on ne considère qu'un scénario extrêmement simplifié, où seul est pris en compte le changement de composition chimique globale qui accompagne l'augmentation de l'état de maturation d'une apatite à partir d'un stade « i » vers le stade « f », on peut néanmoins tenter de rendre compte du rapprochement observé vers la composition de l'HA stœchiométrique. Dans les conditions de synthèse en question ici, la concentration en ions calcium en solution est très faible, alors que les ions phosphate sont présents en grande quantité. La possibilité d'une incorporation additionnelle d'ions Ca^{2+} , depuis la solution vers le précipité, apparaît donc peu probable pour expliciter le processus de maturation. Au contraire, la possibilité de libérer des ions phosphate (probablement sous la forme d'ions H_2PO_4^- qui sont particulièrement solubles à pH neutre/physiologique) depuis le solide vers la solution apparaît bien plus probable. En effet, il est raisonnable d'envisager des mouvements de protons, en surface des nanocristaux d'apatite, entre ions HPO_4^{2-} voisins (très nombreux en début de précipitation) pouvant alors mener à la formation d'ions H_2PO_4^- potentiellement libérés en solution (ce qui a alors pour effet d'augmenter le rapport molaire Ca/P par diminution du dénominateur, et donc de se rapprocher de la composition stœchiométrique). Dans ces conditions, ce scénario simpliste pourrait alors être décrit par le biais d'une équation bilan du type :



où les espèces $\text{H}_2\text{O}_{(\text{liq})}$ et $\text{H}^+_{(\text{aq})}$ ont été préférées à $\text{OH}^-_{(\text{aq})}$ compte-tenu du pH (voisin de 7) auquel ces maturations sont effectuées. Dans ce contexte, à partir des données reportées sur le Tableau 32, on peut alors estimer la variation d'énergie libre à 298 K entre deux états de maturation caractérisés chacun par une composition chimique donnée, et la Figure 46 reporte l'évolution de la différence d'énergie libre ainsi calculée (en prenant la maturation 20 minutes comme point de référence).

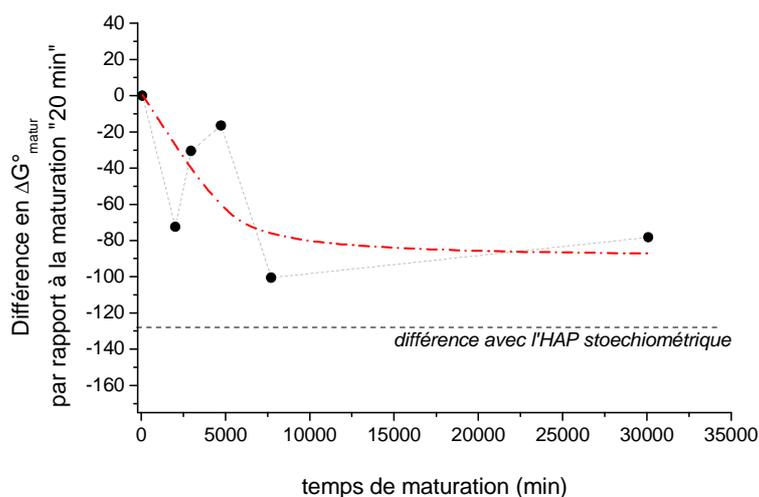


Figure 46. Evolution de la différence en énergie libre évaluée pour le processus de maturation de la phase apatitique, par rapport à la maturation 20 minutes prise pour référence

Bien que ces considérations soient, par définition, approximatives pour évaluer la force thermodynamique à l'origine du processus de maturation, et malgré une dispersion non négligeable des points, l'évolution générale de cette grandeur (diminution dans les valeurs négatives) va bien dans le sens attendu d'une évolution spontanée, et conforte ainsi nos observations expérimentales. Ce type de calcul doit bien entendu être considéré avec précaution car, comme nous l'indiquons précédemment, il ne tient compte que de la variation globale de composition chimique au cours de la maturation alors que le phénomène de maturation implique également diverses autres modifications non prises en compte dans ce calcul simple.

Dans un autre ordre d'idée, les valeurs expérimentales de ΔG_f° pour les différentes apatites plus ou moins maturées pourraient théoriquement aussi être utilisées dans le but d'estimer la

variation d'énergie libre $\Delta G^\circ_{\text{diss}}$ accompagnant la réaction de dissolution de telles apatites, permettant alors d'évaluer leur produit de solubilité K_{sp} à partir de l'équation :

$$\Delta G^\circ_{\text{diss}} (\text{apatite}) = - 2\,303 \cdot RT \cdot \text{Log}(K_{\text{sp}}(\text{apatite}))$$

Par exemple, pour l'HA stœchiométrique, la réaction de dissolution peut s'écrire :

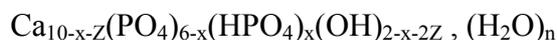


Cependant, plusieurs études de la littérature ont indiqué qu'il n'était pas possible d'établir une valeur constante du produit de solubilité pour ces apatites nanocristallines, contrairement au cas de l'HA stœchiométrique par exemple. Cette observation a mené au concept d'équilibre métastable de solubilité (« Metastable Equilibrium Solubility », ou « MES ») et a été longuement étudié par divers auteurs [Hsu1994, Baig1996, Chhetry1999]. Ce pseudo-équilibre ne correspond pas à l'équilibre thermodynamique vrai et peut s'en trouver nettement déplacé. Il identifie une situation où la dissolution (relativement rapide au début) a pratiquement stoppé et où l'on ne discerne pas, à l'échelle temporelle des manipulations, de phénomènes de germination / croissance. Ce comportement a été notamment relié à l'état de cristallinité de ces composés (les quantités dissoutes dépendant de l'état de cristallinité « local ») et à l'existence de microcontraintes au sein des cristaux [Baig1999].

II.5. Conclusion

Dans ce chapitre, l'objectif était de caractériser finement chaque échantillon d'ANB après différents stades de maturation en solution, en vue notamment d'apporter des éléments de compréhension sur ce processus. Les résultats corroborent les travaux antérieurs, tout en apportant divers compléments d'ordre physico-chimique et thermodynamique. Les ANB sont structurées en un cœur apatitique entouré d'une couche hydratée où les espèces mobiles dites non-apatitiques évoluent avec la maturation, sous l'effet d'un élan thermodynamiquement favorable.

Dans cette étude, la synthèse des apatites biomimétiques par précipitation à température ambiante et à pH voisin du pH physiologique ($\text{pH} \approx 7,4$) a conduit à des apatites monophasiques faiblement cristallisées de taille nanométrique, et de composition chimique globale pouvant être décrite par la formule :



Le temps de maturation en solution du précipité d'apatite biomimétique a une influence importante sur les caractéristiques physico-chimiques des poudres d'ANB, que nous avons suivie :

→ Leur composition chimique se rapproche de la stœchiométrie, avec un rapport molaire Ca/P qui augmente et passe au-delà de la valeur de 1,5 (caractéristique des phosphates tricalciques) après 1 semaine de maturation.

→ La teneur en eau des composés est quasiment divisée par deux entre les ANB maturées 20 minutes et 3 semaines : elle évolue respectivement de $n = 5,94$ moles à 3,28 moles par unité formulaire d'ANB (contenant 6 moles de phosphate).

→ Les ions HPO_4^{2-} sont majoritaires dans la couche hydratée et représentent 70 % et 90 % des ions phosphate non-apatitiques respectivement dans les ANB maturées 20 minutes et 3 semaines.

→ Les ions OH^- , présents uniquement dans le cœur apatitique, ne sont discernables qu'au-delà de 3 heures de maturation.

→ Les ions Ca^{2+} sont présents à plus de 80 % dans le cœur apatitique.

Du point de vue morphologique, au début de la maturation, des nodules sphériques ($\varnothing \approx 15$ nm) sont observés, rappelant la morphologie du TCP amorphe, considéré dans la littérature comme un précurseur de la phase apatite. L'évolution morphologique des grains est très rapide. Au début de la précipitation, l'ANB est sous forme d'un réseau tridimensionnel, constitué de ces nodules, qui semblent mener à des filaments interconnectés après 12h de maturation, probablement via un phénomène de « dissolution – reprécipitation ». Le réseau tridimensionnel se rompt ensuite et laisse place à des filaments individuels après 1 jour de maturation qui s'assemblent ensuite côte-à-côte, probablement via la couche hydratée de surface.

L'augmentation de l'état de cristallinité des ANB maturées se traduit par une augmentation de la taille nanométrique des cristallites et une diminution du désordre cristallin. Cela rend compte d'une meilleure organisation au sein des cristallites. En effet, la teneur en espèces chimiques non-apatitiques décroît en faveur des espèces ioniques du cœur apatitique, dont la composition évolue vers la stœchiométrie.

Le phénomène de maturation de ces apatites biomimétiques a pu être caractérisé quantitativement par le biais de mesures de calorimétrie qui ont permis de montrer le caractère de plus en plus exothermique de l'enthalpie de formation (ΔH_f°) et de l'énergie libre de formation (ΔG_f°) standards des ANB lorsque le temps de maturation augmente. Ces valeurs se rapprochent ainsi progressivement de celles de l'hydroxyapatite stœchiométrique et mettent en évidence une stabilité thermodynamique croissante des phases apatitiques avec la durée de maturation en solution.

Les quantités d'espèces ioniques non-apatitiques $\text{Ca}^{2+}_{\text{non-ap}}$ et $\text{HPO}_4^{2-}_{\text{non-ap}}$ échangés en fonction du temps de maturation sont en accord avec les travaux antérieurs. Ces environnements confèrent aux ANB une réactivité de surface qui diminue parallèlement à la réduction de la teneur des espèces non-apatitiques, présentes dans la couche hydratée, lorsque le temps de maturation de l'ANB augmente.

Ces apatites nanocristallines biomimétiques ont alors fait l'objet d'une étude de consolidation par frittage flash *SPS*, que nous décrivons au Chapitre III, avec comme objectif, l'obtention de biocéramiques cohésives qui préservent une forte réactivité de surface liée au caractère labile d'espèces non-apatitiques présentes au sein d'une couche hydratée en surface des cristaux, que nous avons tenté de préserver après consolidation.