



HAL
open science

Apatites biomimétiques - Des biominéraux aux analogues de synthèse pour le biomédical

Christophe Drouet, David Grossin, Christèle Combes, Stéphanie Sarda,
Sophie Cazalbou, Christian Rey

► **To cite this version:**

Christophe Drouet, David Grossin, Christèle Combes, Stéphanie Sarda, Sophie Cazalbou, et al.. Apatites biomimétiques - Des biominéraux aux analogues de synthèse pour le biomédical. Les Techniques de l'Ingenieur, 2018, pp.1-28. hal-03463257

HAL Id: hal-03463257

<https://hal.science/hal-03463257>

Submitted on 9 Dec 2021

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

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



Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an Author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/25092>

To cite this version:

Drouet, Christophe^{ORCID} and Grossin, David^{ORCID} and Combes, Christèle^{ORCID} and Sarda, Stéphanie^{ORCID} *Apatites biomimétiques - Desbiominéraux aux analogues desynthèse pour le biomédical*. (2018) Biomédical - Pharma | Technologies biomédicales. 1-28.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

Apatites biomimétiques - Des biominéraux aux analogues de synthèse pour le biomédical

par **Christophe DROUET, David GROSSIN, Christèle COMBES, Stéphanie SARDA, Sophie CAZALBOU, Christian REY**

Mots-clés

Minéral osseux | Analogue de synthèse | Couche hydratée | Phosphate de calcium

Résumé Les apatites constituent une vaste famille de composés inorganiques, incluant les apatites phosphocalciques rencontrées dans le domaine des biomatériaux. Cet article se focalise sur les apatites nanocristallines, présentes au sein de l'os ou de la dentine, et pour lesquelles des analogues de synthèse ou apatites biomimétiques peuvent être préparés en vue d'applications biomédicales. Différents aspects sont abordés concernant leurs caractéristiques propres et propriétés physico-chimiques et thermodynamiques, leur élaboration et mise en forme, ainsi que leurs applications principalement dans le domaine des substituts osseux mais également en nanomédecine à visée diagnostique ou thérapeutique.

Keywords

bone mineral | synthetic analog | hydrated layer | calcium phosphate

Abstract Apatites constitute a family of inorganic compounds. In particular, calcium phosphate apatites are particularly relevant in the biomaterials field. This article focuses on nanocrystalline apatites that are for example present in bone and dentin, and for which synthetic analogs called "biomimetic apatites" can be prepared and used for biomedical applications. Various aspects are addressed concerning their specific characteristics, their physicochemical and thermodynamic properties, their preparation and processing, and their biomedical use mainly as bone substitutes but also in nanomedicine, for diagnosis or therapy.

Apatites biomimétiques

Des biominéraux aux analogues de synthèse pour le biomédical

par **Christophe DROUET**

*Docteur en sciences des matériaux
Directeur de recherche CNRS, Laboratoire CIRIMAT (Toulouse), France*

David GROSSIN

*Docteur en chimie des matériaux
Maître de conférences à l'Institut national polytechnique de Toulouse,
Laboratoire CIRIMAT (Toulouse), France*

Christèle COMBES

*Docteur en science des matériaux
Professeur à l'Institut national polytechnique de Toulouse,
Laboratoire CIRIMAT (Toulouse), France*

Stéphanie SARDA

*Docteur en sciences des matériaux
Maître de conférences à l'université Toulouse III Paul Sabatier,
Laboratoire CIRIMAT (Toulouse), France*

Sophie CAZALBOU

*Docteur en sciences et génie des matériaux
Maître de conférences à l'université Toulouse III Paul Sabatier,
Laboratoire CIRIMAT (Toulouse), France*

et **Christian REY**

*Docteur en sciences physiques
Professeur émérite, Institut national polytechnique de Toulouse,
Laboratoire CIRIMAT (Toulouse), France*

Les **apatites nanocristallines** sont des composés de type céramique rencontrés naturellement dans certains biominéraux. Il est par ailleurs possible de **synthétiser des analogues biomimétiques** (de caractéristiques proches des apatites biologiques) en conditions bio-inspirées. Ces composés diffèrent significativement des apatites géologiques ou encore d'hydroxyapatite préparée à haute température. Qu'elles soient d'origine biologique ou de synthèse, les apatites nanocristallines présentent en effet certaines caractéristiques propres : des cristaux nanométriques, une composition chimique sous-stœchiométrique en ions calcium et hydroxydes et qui contient des anions divalents tels que HPO_4^{2-} et/ou CO_3^{2-} , une morphologie allongée généralement plaquettaire, et leurs nanocristaux sont constitués d'un cœur apatitique recouvert d'une couche ionique hydratée non apatitique contenant des ions particulièrement mobiles. La présence de cette couche de surface confère aux nanocristaux une réactivité exceptionnelle pouvant notamment être mise à profit dans des réactions d'échanges ioniques ou d'adsorption moléculaire (biomolécules, médicaments...) et permettant de conférer des propriétés additionnelles à ces composés (antibactériennes, anti-résorptives, luminescence...). Les nanocristaux sont thermodynamiquement **métastables** et évoluent progressivement lorsqu'ils sont en conditions humides, permettant de mimer un minéral

osseux plus ou moins mature. Il est possible de mettre en forme ces apatites biomimétiques en vue d'applications biomédicales variées, non seulement pour la **régénération osseuse** mais aussi en nanomédecine pour le diagnostic médical ou la thérapie cellulaire. Mais les techniques de mise en forme utilisées, incluant les opérations de frittage, se doivent de prendre en compte ce caractère métastable en mettant en œuvre par exemple des approches « basses températures ». De même, la caractérisation physico-chimique de ces composés doit être menée avec précaution afin de ne pas altérer les nanocristaux pendant l'analyse.

Points clés

Domaines. Biomatériaux. Biomimétisme. Nanomédecine. Biominéraux. Phosphates de calcium

Degré de diffusion de la technologie. Maturité

Technologies impliquées. Synthèse d'analogues biomimétiques au minéral osseux. Caractérisation physico-chimique et thermodynamique. Mise en forme de biomatériaux par « chimie douce »

Domaines d'application. Biomatériaux osseux. Nanoparticules pour la thérapie cellulaire/l'imagerie médicale

Principaux acteurs français.

- Pôles de compétitivité : Cancer-Bio-Santé, Pôle Européen de la Céramique, Medicen Paris Region, Nutrition Santé Longévité,...

- Groupements de recherche : GdR CNRS Réparer l'humain, Commission « Matériaux pour la Santé » (SF2M/GFC/Cefracor/Titane), Association Biomat, Institut Carnot Chimie Balard Cirimat...

- Industriels : 3D CERAM, BIOCETIS, BIOMATLANTE, CERAVER, EINCOBIO, GRAFTYS, HIMED, KASIOS, MARION TECHNOLOGY, MEDICAL GROUP, NORAKER, SBM, SUBTILIS BIOMATERIALS, TEKNIMED,...

Autres acteurs dans le monde : AAP IMPLANTS, CAM BIOCERAMICS, DEPUY SYNTHES, ETEX, EUROCOATING, FINCERAMICA, NOBEL BIOCARE, ORCHID ORTHO, STRYKER,...

Contact : Christophe.Drouet@cirimat.fr

Symbole	Description	Unité
$\nu_4\text{PO}_4$	Exemple de notation d'un mode de vibration en spectroscopie vibrationnelle (IR, Raman)	-
$\Delta G_{\text{diss}}^\circ$	Variation d'enthalpie libre molaire standard pour la réaction de dissolution (en milieu aqueux) d'une apatite	kJ/mol
ΔG_f°	Enthalpie libre molaire de formation standard d'une apatite (à partir des éléments pris dans leur état standard)	kJ/mol
ΔH_f°	Enthalpie molaire de formation standard d'une apatite (à partir des éléments pris dans leur état standard)	kJ/mol
ΔS_f°	Entropie molaire de formation standard d'une apatite (à partir des éléments pris dans leur état standard)	J.mol ⁻¹ .K ⁻¹
T	Température	K
Q	Quantité adsorbée de l'élément X	mol/g ou mol/m ²
Q^m	Quantité adsorbée de l'élément X à saturation	mol/g ou mol/m ²
K^{ex}	Constante d'équilibre de la réaction d'échange ionique	-
Ca/P et Ca/(P + C)	Rapports molaires pour la composition chimique de l'apatite en question	-

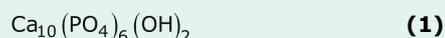
1. Apatites dans les biominéraux

Les biominéraux à base de phosphate de calcium se rencontrent dans tous les règnes du monde vivant [1] [2], des bactéries aux formes de vie les plus élaborées. Souvent, ces phosphates de calcium se présentent sous forme amorphe intracellulaire de composition chimique assez mal définie. Chez les vertébrés, cependant, ils existent essentiellement sous forme cristallisée extracellulaire de structure « apatite » (os, dents, écailles des poissons, défenses, bois des cervidés...). Des calcifications pathologiques ou *ectopiques* de tissus mous, de nature apatitique, sont également observées [3] (calcifications cutanées, des vaisseaux sanguins, de cartilages hyalins, de glandes, calcifications associées à des tumeurs cancéreuses). Ce bref aperçu du paragraphe 1 porte essentiellement sur les biominéraux des tissus durs des vertébrés que sont l'émail dentaire, la dentine et l'os.

1.1 Caractéristiques communes des biominéraux apatitiques

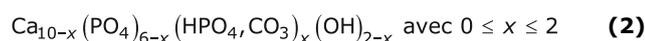
Les **apatites** constituent une vaste famille de composés minéraux et de nombreuses descriptions ont été publiées [4].

Le modèle phare des apatites biologiques est l'**hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique (notée HAP ou HA)** représentée par la formule chimique :



Toutefois les apatites d'origine biologique sont assez éloignées de cette composition idéale (tableau 1) [5] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] et, à l'exception de l'émail dentaire, elles sont généralement faiblement cristallisées. Cet état est dû à leur caractère nanocristallin et à l'existence de nombreuses substitutions des ions minéraux principaux et de lacunes ioniques, responsables d'une grande hétérogénéité de composition entre les tissus minéralisés, mais aussi à l'intérieur de ces tissus et jusqu'aux cristaux. Ces différences entre apatites biologiques et le modèle de l'hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique mènent à d'importants écarts de comportement physico-chimique et biologique (solubilité, stabilité thermodynamique, capacité à évoluer en solution, à s'équilibrer avec les fluides environnants, à adsorber diverses molécules, comportement cellulaire (adhésion/prolifération/différenciation), résorption *in vivo*...).

Différents modèles plus représentatifs des minéralisations de tissus durs ont été proposés. La première correction importante vient de l'observation que des ions carbonate CO_3^{2-} et hydrogénophosphate HPO_4^{2-} sont toujours présents dans les minéralisations biologiques. Les études d'apatites de synthèse contenant ces ions ont permis de proposer un **modèle d'apatite** contenant ces deux types d'ions comme représentatives des apatites biologiques [6] [7] :



Dans ces apatites, les ions bivalents HPO_4^{2-} et CO_3^{2-} se substituent aux ions PO_4^{3-} ; la neutralité électrique du réseau cristallin est assurée par la création d'une lacune cationique et d'une lacune dans les sites des ions hydroxyde, représentées par la variable x . Ce modèle a été appliqué avec succès à des tissus durs variés de différentes

espèces et à des âges différents. Il permet notamment d'expliquer le fort déficit en ions OH^- des apatites biologiques, maintes fois observé [8]. Il ne rend pas compte cependant de la présence dans les minéralisations biologiques d'environnements non apatitiques des ions minéraux suspectés dans différents travaux précurseurs [9] [10] et révélés par les techniques spectroscopiques [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17].

Un **nouveau modèle** a donc été proposé, plus fidèle aux caractéristiques et à la réactivité des apatites biologiques, qui introduit l'existence d'une **couche ionique hydratée**, renfermant les ions minéraux en site non apatitique (c'est-à-dire dans des positions ne correspondant pas aux positions cristalographiques d'une apatite), en surface des nanocristaux (figure 1).

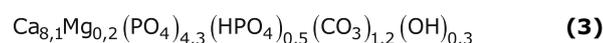
Une des caractéristiques des biominéraux apatitiques est leur adaptabilité à la fonction biologique des organes. Différents niveaux d'adaptation ont été distingués [5] [8] :

- d'un point de vue tissulaire : taux de minéralisation, dimension et orientation des cristaux ;
- au niveau de la physico-chimie de ces cristaux : composition chimique, développement et évolution de la couche ionique hydratée.

1.2 Os

L'**os** est un matériau composite formé d'une matrice collagénique (organique) minéralisée (inorganique). Il existe différents types d'os de composition variable, et cette hétérogénéité persiste jusqu'au sein de l'organe selon l'étape de remodelage en cours.

La composition moyenne d'un os humain d'adulte est généralement représentée par la formule chimique suivante, qui utilise le modèle simplifié (2) et ne considère que les constituants essentiels de la phase minérale (voir tableau 1) :



La teneur en lacunes est proche du maximum ($x = 1,7$). La teneur en ions OH^- calculée ne tient pas compte de la présence d'ions comme les chlorures ou les carbonates qui pourraient en partie les substituer (carbonates dits de type A). Dans la pratique, la teneur en ions OH^- des os, estimée par méthodes spectroscopiques (IR, RMN), varie dans un large domaine (50-0 % de la teneur de l'HAP), dispersion attribuée à de mauvaises conditions de conservation ou d'observation [8] ; en effet, le minéral osseux peut s'altérer très facilement. Sur des os fraîchement extraits, les ions OH^- ne sont généralement pas détectés ou sont en proportion extrêmement faible [8]. La composition du minéral évolue avec l'âge chez la plupart des espèces : l'os d'un individu jeune est pauvre en carbonate et riche en ions HPO_4^{2-} et la proportion de CO_3^{2-} croît avec l'âge [7] [13] ; toutefois la valeur de x reste quasiment constante.

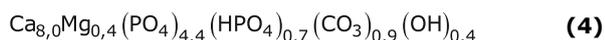
Une autre évolution importante liée à l'âge est la présence de proportions importantes d'ions minéraux non apatitiques (dans la couche hydratée à la surface des cristaux, § 2) dans les os de jeunes individus comparés à ceux des individus âgés [13] [27]. Comme il a été établi que ces ions-là sont en équilibre rapide avec les fluides environnants et participent à l'homéostasie (maintien des concentrations ioniques), on comprend la nécessité du remodelage osseux (remaniement de

l'os par dissolution ostéoclastique puis reprécipitation (ostéoblastique) qui restaure cette capacité du minéral osseux, réservoir de calcium, de phosphate mais aussi de magnésium et peut-être d'autres éléments comme le zinc. La présence de cette couche peut, par ailleurs, expliquer le processus de minéralisation de la matrice de collagène des ostéons au cours du remodelage osseux en deux étapes distinctes [28] [29]. Une étape de minéralisation primaire relativement rapide (quelques semaines) conduit à une proportion de minéral voisine de 75 % de sa valeur finale, limite qui serait liée à la présence importante d'une couche hydratée moins dense que le cœur apatitique dans les cristaux nouvellement formés. Cette étape est suivie d'une minéralisation secondaire qui serait associée à la maturation de l'apatite initialement formée et à la diminution de la couche ionique hydratée, accompagnée d'une croissance des domaines apatitiques plus denses et, corrélativement, à un accroissement du taux de minéralisation qui tend vers sa valeur finale en plusieurs mois voire après des années [5].

1.3 Dentine

La **dentine** est, comme l'os, constituée d'une matrice collagénique minéralisée. Contrairement à l'os toutefois, elle n'est pas soumise au remodelage et le taux de minéralisation est plus élevé que dans le tissu osseux.

La composition chimique de la dentine humaine mature est proche de celle de l'os :

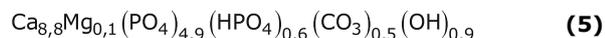


Elle s'en distingue cependant par un taux de carbonate moins élevé et un taux de magnésium plus élevé. On considère que ce tissu joue un rôle essentiellement mécanique de support pour l'émail dentaire.

1.4 Émail dentaire

L'**émail dentaire** est le tissu le plus minéralisé des vertébrés. Sa composition est, comme pour l'os, hétérogène et varie par exemple entre la surface et la jonction émail-dentine. L'émail est un tissu, non vascularisé, acellulaire qui n'est pas régénéré.

L'émail dentaire humain peut être représenté par la formule chimique suivante :



La teneur en lacunes cationiques et anioniques est inférieure à celle du minéral osseux, et les ions OH^- sont ici nettement identifiés dans la structure apatitique. Le taux de carbonatation est également inférieur à celui d'un os et les cristaux présentent des dimensions bien supérieures (microniques) et de manière générale un taux de cristallinité plus élevé, avec comme conséquence une proportion d'environnements chimiques non apatitiques des ions minéraux très inférieure à celle de la dentine ou de l'os. Toutes ces caractéristiques accroissent la résistance à la dissolution acide de ce tissu

exposé à la flore bactérienne buccale et à l'acidité de certains aliments. Nous avons là un bel exemple de l'adaptabilité des apatites à la fonction biologique du tissu.

2. Caractéristiques et propriétés des apatites nanocristallines

2.1 Caractéristiques physico-chimiques

L'hydroxyapatite stœchiométrique HAP se distingue par différentes caractéristiques de la phase apatitique composant le minéral osseux ou la dentine. L'apatite osseuse ou dentinaire présente en effet un faible état de cristallinité en lien avec les dimensions nanométriques de ses cristaux constitutifs ainsi qu'un désordre cristallin essentiellement lié à la sous-stœchiométrie [7]. Le caractère non stœchiométrique est déterminé par la présence d'ions bivalents, notamment des ions phosphate protonés (hydrogénophosphate HPO_4^{2-}) et carbonate CO_3^{2-} . Ces substitutions et les lacunes ioniques associées mènent alors à une diminution de la cohésion tridimensionnelle des cristaux, et donc à une moindre stabilité de ces composés par rapport à l'HAP [30], générant donc des composés plus solubles/résorbables [31] [32].

Les nanocristaux d'apatite, biologiques ou de synthèse [33], présentent un état de surface très particulier mettant en œuvre une couche ionique hydratée qui recouvre un cœur apatitique, lequel est souvent sous-stœchiométrique (figure 1). L'existence de cette couche est supposée provenir des conditions de formation en solution de ces composés [34]. Celle-ci est non seulement constituée d'eau, mais également d'ions tel que Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} ... Ceux-ci n'occupent pas des positions cristallographiques caractéristiques d'une apatite et sont dits « non apatitiques ». Ils génèrent des signatures spectroscopiques très spécifiques (en spectroscopies vibrationnelles infrarouge (IR) et Raman, en résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide...) [35] [36] [37] [38] [39].

Exemple : une contribution IR est observée à 534 cm^{-1} pour les ions HPO_4^{2-} de surface non apatitiques alors que la contribution des ions HPO_4^{2-} de cœur, apatitiques, l'est à 550 cm^{-1} (figure 2) [41] [42].

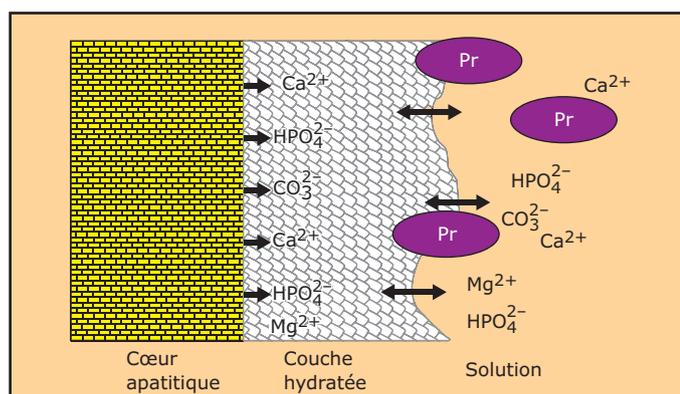
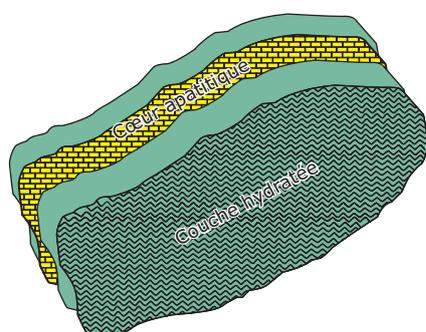
L'observation de signaux spectroscopiques systématiquement à la même position pour ces ions non apatitiques indique l'existence d'une certaine structuration de cette couche d'autant plus manifeste que l'on étudie l'échantillon encore humide, mais sans ordre tridimensionnel à grande distance. Ainsi, cette couche apparaît amorphe et n'est pas directement analysable par diffraction des rayons X (DRX) qui fournit essentiellement des informations sur le cœur apatitique. Les observations en microscopie électronique quant à elles mettent en évidence une morphologie allongée et généralement en plaquettes, mais l'exposition au faisceau peut altérer ces échantillons nanométriques et hydratés, ce qui ne permet pas une observation aisée et directe de la couche de surface.

En modifiant les paramètres de précipitation de l'apatite (température, pH, temps de maturation en solution avant filtration...), il est possible de moduler la proportion de couche hydratée présente sur les nanocristaux, ainsi que la taille de ces derniers, leur degré de sous-stœchiométrie, et taux de cristallinité [33]. Des analyses par RMN du solide ont permis d'évaluer l'ordre de grandeur de l'épaisseur de cette couche

Tableau 1 – Principales caractéristiques des apatites biologiques des tissus durs humains (déterminées à partir de la compilation de Iyengar and Tandon [18], complétée par d'autres travaux [19] à [26], (tableau adapté de [5])

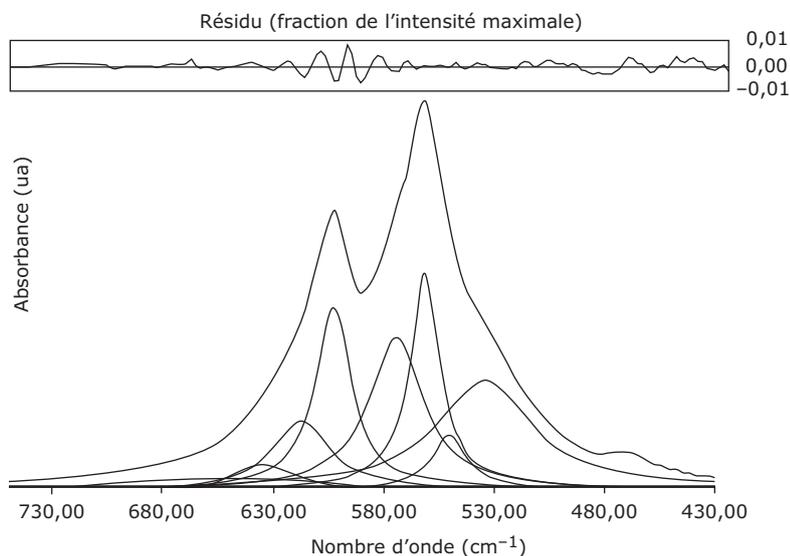
Caractéristique	Os	Dentine	Émail dentaire
Taille moyenne des cristaux	plaquettes 50 × 25 × 10 nm	plaquettes	aiguilles > 100 µm
Rapport minéral/ organique (représenté par le rapport atomique Ca/N)	1,81	2,35	40,0
Éléments majeurs* (% massique, hors oxygène)			
Carbone total	16,7	11,8	1,4
CO ₃ ²⁻	5,6	4,6	3,2
N	4,9	4,0	0,32
Ca	25,4	26,9	36,6
P	11,6	13,2	17,7
Éléments mineurs (% massique)			
Cl	0,13	0,065	0,37
K	0,0047	0,024	0,070
Mg	0,27	0,74	0,29
Na	0,53	0,76	0,77
S	0,08	0,070	0,021
Principaux éléments traces (ppm m/m)			
Al	29	210	55
B	22	-	11
F	400	215	50
Fe	76	44	34
Pb	4,4	15	17
Sr	70	145	173
Zn	205	148	170

*Valeurs de référence pour l'hydroxyapatite stœchiométrique (% massique) : Ca = 39,8 ; P = 18,5



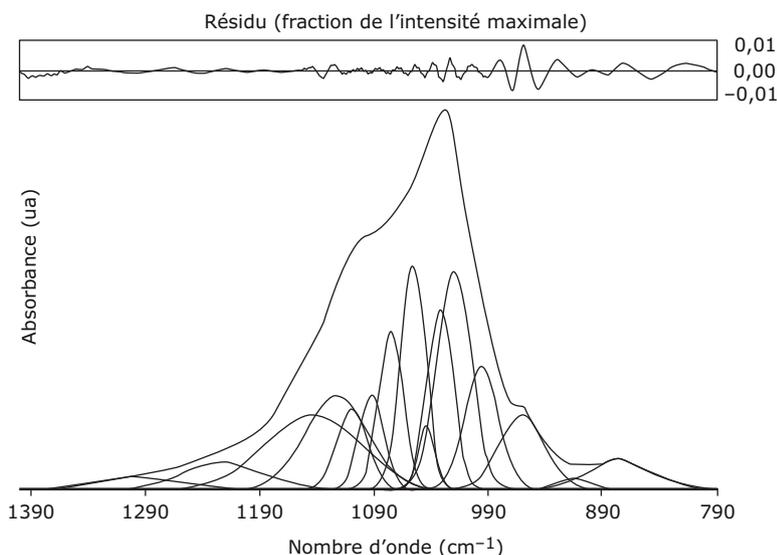
Les cristaux, sous forme de plaquettes, comportent un cœur apatitique et une couche hydratée de surface contenant essentiellement des ions bivalents relativement mobiles et échangeables par des ions de la solution ou des molécules telles que des protéines (Pr). Les domaines apatitiques très stables se développent lentement aux dépens des ions de la couche hydratée.

Figure 1 – Modèle d'apatites biomimétiques nanocristallines



Position (cm ⁻¹)	Attribution
660	eau
635	OH ⁻
617	PO ₄ (na)
602	PO ₄ (a)
574	PO ₄ (a + na)
561	PO ₄ (a)
550	HPO ₄ (a)
534	HPO ₄ (na)
467	v ₂ PO ₄
na : non apatitique a : apatitique	

- a) exemple de décomposition de spectre infrarouge dans le domaine v₄(PO₄) (apatite biomimétique non carbonatée maturée 1 jour). La zone centrale correspondant au pic à 574 cm⁻¹ contient très probablement une contribution importante d'espèces non apatitiques. Les raies les mieux définies et les plus fines peuvent être attribuées à des phosphates apatitiques en se référant à des apatites bien cristallisées. Les phosphates (PO₄ et HPO₄) non apatitiques, aux raies beaucoup plus larges, ne sont apparents que sur les ailes de l'enveloppe, où les raies attribuées aux phosphates apatitiques ont une intensité relativement faibles.**



Position (cm ⁻¹)	Attribution
1296	HPO ₄ (def. OH OCP)
1223	HPO ₄ (def. OH, a + na)
1143	HPO ₄
1123	HPO ₄
1109	HPO ₄ (na)
1092	PO ₄ + HPO ₄
1075	PO ₄ + HPO ₄
1056	PO ₄ (a)
1044	PO ₄ (a)
1032	PO ₄ (a)
1020	PO ₄ (na)
996	-
960	v ₁ PO ₄ (a)
915	HPO ₄ (el. P-OH, OCP)
875	HPO ₄ (el. P-OH, a + na)
na : non apatitique a : apatitique def : déformation angulaire el : élongation	

- b) exemple de décomposition de spectre infrarouge dans le domaine v₃(PO₄) (apatite biomimétique non-carbonatée maturée 1 jour). Les attributions sont basées sur celles de Fowler et al. [41] pour le phosphate octocalcique (OCP) et celles proposées par Paschalis et al. [42]. Bien que les bandes v₃(PO₄) soient les plus intenses des ions phosphate en spectroscopie infrarouge, les différentes composantes sont ici beaucoup moins bien résolues que pour la bande v₄(PO₄) ; la décomposition n'est pas unique et reste plus aléatoire, de plus aucune correspondance n'a pu être quantitativement établie.**

Figure 2 – Signatures spectroscopiques caractéristiques des apatites nanocristallines

sur des nanocristaux d'apatite correspondant à un état de maturation moyen [39], de l'ordre du nanomètre, donc très significatif pour des nanocristaux mesurant typiquement quelques dizaines de nanomètres dans le sens de la longueur. Des estimations de l'épaisseur de cette couche « amorphe » observée par MET [40], typiquement de l'ordre de 1-2 nm, sont en bonne adéquation avec les mesures RMN (bien que des précautions doivent être prises sur ces mesures compte tenu de la sensibilité des nanocristaux au faisceau d'électrons). Cette couche, dont les ions constitutifs (Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , mais aussi des ions « secondaires » tels que Mg^{2+} , etc.) sont aisément mobilisables par exemple en solution, est à l'origine de propriétés de surface exceptionnelles du minéral osseux et des apatites biomimétiques de synthèse (§ 2.3).

En résumé, les apatites nanocristallines biomimétiques sont caractérisées par :

- les dimensions nanométriques de leurs cristaux ;
- leur sous-stœchiométrie ;
- la présence d'anions bivalents (HPO_4^{2-} , CO_3^{2-}) et d'une couche de surface non apatitique hydratée ;
- une morphologie allongée souvent plaquettaire.

Les caractères nanométriques et hydratés ainsi que la non-stœchiométrie, qui diffèrent drastiquement du cas de l'hydroxyapatite stœchiométrique bien cristallisée, expliquent leur **métastabilité**.

2.2 Propriétés thermodynamiques

Les apatites peuvent intégrer bon nombre d'éléments de la classification périodique [43] [AF6610] ainsi que des lacunes en sites Ca et OH. Comme expliqué dans le paragraphe 1, les biominéraux apatitiques peuvent exploiter cette possible variabilité en termes de composition chimique et degré de stœchiométrie pour s'adapter aux différentes fonctions des organismes dans lesquels ils sont produits. Cette adaptabilité est à rapprocher de la différence de stabilité thermodynamique entre l'HAP et les apatites nanocristallines sous-stœchiométriques. En effet, la solubilité d'une apatite (et sa résorption *in vivo* [31] [32]) dépend fortement de sa composition chimique et de son caractère plus ou moins lacunaire. Cette solubilité est directement liée à l'enthalpie libre accompagnant la réaction de dissolution $\Delta G_{\text{diss}}^{\circ}$, elle-même liée à l'enthalpie libre de formation standard ΔG_f° ($\Delta G_f^{\circ} = \Delta H_f^{\circ} - T\Delta S_f^{\circ}$) de l'apatite en question. De manière générale pour des oxydes complexes tels que les apatites, ΔG_f° est largement dominé (sauf à haute température) par la contribution enthalpique ΔH_f° nettement majoritaire par rapport à la part entropique $-T\Delta S_f^{\circ}$. Des mesures calorimétriques réalisées sur des apatites biomimétiques non carbonatées présentant des états de maturation différents ont permis de mesurer de tels ΔH_f° , puis de remonter à la stabilité relative de ces apatites moyennant une approximation sur l'entropie [30]. L'apatite est d'autant plus stable qu'elle est proche de la stœchiométrie. Outre la stœchiométrie, la composition élémentaire de l'apatite induit aussi des modifications significatives des propriétés thermodynamiques et donc de la solubilité du composé [44] [45] [46] [47] [48]. Un modèle thermodynamique prédictif des propriétés thermodynamiques d'apatites, notamment hydratées, en fonction de leur composition chimique a été développé sous la forme du logiciel libre *Therm'AP* [49].

2.3 Réactivité : échanges ioniques et adsorption

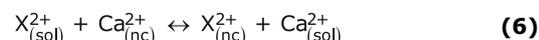
Une caractéristique importante des apatites nanocristallines biomimétiques est liée à leur réactivité, c'est-à-dire à leur capacité à interagir avec le milieu environnant et à participer à des réactions d'échange ou d'adsorption d'espèces ioniques ou moléculaires. Ces composés peuvent ainsi jouer un rôle important dans l'homéostasie et peuvent quelquefois se comporter comme un réservoir d'espèces actives (ioniques ou moléculaires) capables d'orienter le comportement biologique (bénéfique ou toxique) ou d'initier une action thérapeutique [50].

La réactivité de surface des apatites nanocristallines est en lien direct avec la présence de la couche hydratée décrite dans le paragraphe 1.1, qui permet échanges ioniques de surface et adsorption moléculaire.

2.3.1 Échanges ioniques

La proportion des échanges ioniques dépend de la composition du milieu dans lequel se trouvent les nanocristaux (espèces ioniques environnantes, concentration), mais leur capacité à participer à ces échanges est toujours liée au stade de maturation de l'apatite et diminue considérablement au cours de la maturation en raison de la diminution de l'étendue de la couche hydratée de surface [51] [52] [53]. En effet, les réactions d'échange s'effectuent toujours par l'intermédiaire de la couche hydratée de surface qui interagit avec la solution environnante. Ainsi, seuls les ions facilement mobilisables (dits « ions labiles ») de cette couche sont impliqués dans des équilibres avec le milieu aqueux environnant et sont susceptibles d'intégrer la structure apatitique au cours du processus de maturation selon leur propension à s'incorporer au réseau cristallin.

L'adsorption des ions provenant d'une solution d'échange peut alors être décrite par une **isotherme du type Langmuir** [AF3688] dans laquelle il est nécessaire de considérer non plus l'élément adsorbé seul, mais l'élément adsorbé et l'ion désorbé par une réaction d'échange ionique [54]. Ainsi, si l'on considère un échange entre les ions Ca^{2+} contenus dans les nanocristaux (nc) et les ions X^{2+} de la solution environnante (sol) correspondant à l'échange ionique :



alors la représentation du type Langmuir peut s'exprimer comme suit :

$$Q = Q_m \frac{K_{\text{ex}} [(X)/(Ca)]}{1 - K_{\text{ex}} [(X)/(Ca)]} \quad (7)$$

avec Q quantité adsorbée de l'élément X,
 Q_m quantité adsorbée de l'élément X à saturation,
 K_{ex} constante d'équilibre de la réaction d'échange ionique,
 (X) et (Ca) activité ionique des espèces X^{2+} et Ca^{2+} à l'équilibre en solution.

Cette représentation permet d'expliquer que *seul* le rapport X/Ca influence la quantité adsorbée et que lorsque les ions minéraux étrangers X intègrent la couche hydratée, ils sont disponibles par une réaction d'échange inverse par simple

ajout de calcium à la solution environnante ou tout autre ion capable de se substituer à X. Comme la réaction directe d'échange d'ions, les réactions inverses sont rapides (quelques minutes) mais incomplètes et un résidu d'ion étranger reste toujours présent dans les nanocristaux. La quantité d'ions rémanents dépend alors de l'espèce ionique considérée [52] [53] [55].

Cependant, le comportement des ions minéraux étrangers peut être différent lorsque les nanocristaux sont laissés en contact avec la solution environnante et que le processus de maturation est impliqué. On distingue alors deux types d'ions [53] [56] :

- les ions qui peuvent être incorporés au cours de la maturation dans le réseau apatitique en développement, en se substituant aux ions calcium, phosphate ou OH^- . Ils ne perturbent alors pas le processus de maturation et à mesure qu'ils pénètrent le réseau apatitique, leur concentration dans la couche hydratée diminue. C'est le cas des ions Sr^{2+} , CO_3^{2-} , Cl^- et F^- par exemple, dont la proportion qui a pénétré le réseau apatitique est rendue indisponible pour participer aux échanges ioniques. Leur libération n'est alors possible que lorsque les cristaux sont dissous, notamment en milieu acide par l'action des cellules ostéoclastes impliquées dans le processus de remodelage osseux ;

- les ions qui ne peuvent pas pénétrer ou qui pénètrent en quantité très limitée dans les domaines apatitiques. C'est le cas des ions Mg^{2+} qui restent dans la couche hydratée, stabilisent celle-ci [53] et sont facilement disponibles pour être échangés rapidement. Leur libération se fait spontanément par simple réaction d'échange inverse avec les ions calcium provenant des fluides biologiques.

Outre les échanges ioniques de surface, le cœur apatitique des nanocristaux peut lui aussi voir ses propriétés modulées par le biais, lors de sa formation, de substitutions ioniques :

- les ions Ca^{2+} du réseau apatitique peuvent par exemple être substitués pendant la synthèse par une grande variété de cations, tels que Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , mais aussi Ti^{4+} , Li^+ , Na^+ ou Y^{3+} ;

- les ions PO_4^{3-} par CO_3^{2-} (carbonates de type B), HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , VO_4^{3-} , AsO_4^{3-} ou SiO_4^{4-} ;

- les ions OH^- par F^- , Cl^- , O_2^- mais aussi CO_3^{2-} (type A).

Mais les ions ne se substituent pas avec la même facilité, ce qui est en lien avec les aspects thermodynamiques déjà évoqués (§ 2), et les quantités insérées dépendent notamment de la taille de l'ion « étranger » incorporé et de sa charge [57]. Dans le cas des substitutions d'ions de même charge, l'écart de taille par rapport à l'ion de référence influence clairement la capacité à intégrer le réseau apatitique. Dans le cas des substitutions d'ions de charges différentes, la nécessité de réorganiser le réseau apatitique pour compenser les charges limite considérablement leur capacité à pénétrer le réseau.

La couche hydratée offre une plus large gamme de substitution et d'adsorption d'ions que le réseau d'apatite lui-même.

2.3.2 Adsorption moléculaire

Les apatites nanocristallines ont aussi la capacité d'adsorber des biomolécules ou autres molécules organiques. L'**adsorption de protéines et principes actifs** joue un rôle déterminant pour les tissus minéralisés dans le contrôle de la germination, croissance et dissolution *in vivo* des cristaux d'apatites biologiques [58] [59] et également dans la bio-intégration des matériaux apatitiques [60]. Dans la plupart des cas, ces molécules d'intérêt biologique présentent une grande affinité pour la surface des apatites ; mais si l'adsorption de biomolécules à la surface d'apatites bien cristallisées a été largement étudiée [61] [62] [63], moins d'études concernent

l'adsorption sur des apatites nanocristallines biomimétiques malgré des caractéristiques physico-chimiques beaucoup plus proches du minéral osseux.

Comme pour les échanges ioniques, l'adsorption sur apatites nanocristallines est généralement bien décrite par le **modèle de Langmuir**, comme reporté dans la littérature pour diverses molécules biologiques comme des protéines/facteurs de croissance impliquées dans le processus de minéralisation [63] [64] [65], des acides aminés [66] ou encore des molécules thérapeutiques [67]. Toutefois, la faible adsorption observée pour certains acides aminés comme la sérine ou la glycine, ou des molécules interagissant plus faiblement avec la surface apatitique comme l'acide acétique [68], la doxorubicine [69] ou la tétracycline [70], ou encore de nucléotides ou d'ADN [71] [72] [73] [74] est mieux décrite par d'autres modèles tels que l'isotherme de type Freundlich [66] ou encore de Sips (encore appelé isotherme de Langmuir-Freundlich), lequel prend en compte l'hétérogénéité de la surface et/ou le caractère polyélectrolyte de l'adsorbat. L'interaction entre la surface des cristaux d'apatite et une molécule est fonction de la composition et de la conformation de cette dernière. L'affinité élevée de la phosphosérine pour les apatites nanocristallines comparée à celle de la sérine a ainsi été expliquée par l'existence de groupements terminaux phosphatés sur la molécule capable d'interagir fortement avec la surface d'apatite [66].

Le suivi des concentrations ioniques en solution au cours de l'adsorption permet d'indiquer si le mécanisme d'adsorption est « simple » ou s'il implique un processus d'échange entre des ions issus de la surface des nanocristaux et des groupements terminaux chargés provenant des biomolécules en solution dans le milieu environnant. Par exemple, dans le cas des traitements de maladies osseuses, l'activité biologique des molécules de bisphosphonates utilisées comme agents d'anti-résorption est liée à leur capacité d'adsorption sur le minéral osseux ; il a été démontré que la réaction d'adsorption sur apatites nanocristallines peut être décrite par un processus d'échange entre les ions phosphate en surface des nanocristaux apatitiques et les groupements phosphonates des molécules adsorbées [75] (il est probable que dans les apatites carbonatées l'ion carbonate puisse également être impliqué). Toutefois, plusieurs processus peuvent perturber l'équilibre d'adsorption : la précipitation possible de sels de calcium (ou phosphate) formés avec la molécule en solution et/ou l'équilibre de dissolution des solides. De plus, les mécanismes impliqués dans l'adsorption de macromolécules peuvent inclure des changements de conformation et des interactions entre molécules adsorbées [63] [76].

Un aspect intéressant de l'adsorption sur apatites nanocristallines est la variation des paramètres d'adsorption en fonction des **caractéristiques physico-chimiques** des nanocristaux. La quantité de biomolécules adsorbées à saturation est plus importante à la surface d'apatites nanocristallines que sur celle d'apatites bien cristallisées, ce qui pourrait s'expliquer par le nombre de sites non apatitiques en surface et le caractère nanocristallin. En particulier, lorsque le processus d'adsorption implique un échange ionique avec la surface du support apatitique, la quantité de molécules adsorbées est liée à la quantité d'ions minéraux labiles (facilement échangeables) disponibles dans la couche hydratée et donc à la proportion de cette couche hydratée. Ainsi, les propriétés d'adsorption des biomolécules sont fortement dépendantes non seulement des propriétés chimiques des molécules adsorbées, mais aussi des caractéristiques des nanocristaux d'apatite et leur état de maturation [64] [77]. Une augmentation de la constante d'affinité et une diminution de la quantité maximale adsorbée par unité de surface ont été observées avec

l'augmentation du temps de maturation initial. Ces résultats ont été expliqués par la présence de la couche hydratée riche en ions labiles à la surface des nanocristaux potentiellement échangeables et par l'influence du temps de maturation sur le développement de cette couche hydratée et sur sa composition [77] [78]. De plus, il est à noter que les paramètres d'adsorption sur apatites peuvent varier selon les conditions telles que la température, le pH et la présence d'ions minéraux dans la solution environnante. Concernant l'adsorption de médicaments ou de protéines, ces observations ont reçu différentes interprétations incluant des variations de la charge superficielle et/ou énergie de surface des cristaux, ou encore des changements de conformation ou de spéciation de la molécule en solution [66] [67] [79] [80].

Dans le cas où l'adsorption est associée à un échange ionique, une caractéristique majeure de ce processus est alors l'**irréversibilité** de la réaction vis-à-vis de la dilution. Ici, aucune désorption n'est en effet possible par simple dilution ou lavage des échantillons. Seule une dissolution du support apatitique ou encore la présence dans la solution d'une espèce chimique apte à déplacer la molécule adsorbée peut permettre sa libération [77] [81]. Ce comportement peut être utilisé *in vivo* en vue de la libération contrôlée de principes actifs. En effet, les molécules bioactives telles que des facteurs de croissance ou agents thérapeutiques sont généralement incorporées dans les biomatériaux par simple imprégnation, mais de telles associations n'en permettent pas un greffage spécifique et la libération à partir de tels supports est souvent difficile à contrôler. Au contraire, l'adsorption de molécules d'intérêt biologique (ex : antimicrobiens, anticancéreux, hémostatiques, anti-ostéoporotiques...) sur nanocristaux d'apatites permet de contrôler la quantité associée à l'implant ainsi que la dose délivrée [65] [79] [82]. Comme les propriétés d'adsorption dépendent fortement des caractéristiques physico-chimiques des nanocristaux, la cinétique de libération dépend également des propriétés des supports apatitiques [67] [83]. Ainsi il est possible de délivrer des principes actifs adaptés aux besoins thérapeutiques [61] [83] [84] ou encore d'améliorer l'activité biologique de biomatériaux osseux implantables pour des applications osseuses [65].

3. Biomimétisme des biominéraux : choix des propriétés à imiter

Le développement d'apatites nanocristallines biomimétiques est particulièrement approprié dans le domaine biomédical (§ 5) compte tenu de la préexistence de nanocristaux d'apatite dans le squelette des vertébrés depuis des millions d'années, et donc de leur biocompatibilité « intrinsèque » et de leur réactivité de surface élevée.

Il peut être intéressant de classer les apatites en fonction de leurs caractéristiques plus ou moins proches de celles de l'apatite osseuse – et donc d'évaluer leur caractère plus ou moins biomimétique à l'os. Cela requiert alors de définir les propriétés qu'il peut être judicieux de chercher à imiter pour le développement d'applications biomédicales. Quatre singularités peuvent en particulier se dégager.

– **Caractère nanocristallin** : le fait que les nanocristaux soient de dimensions nanométriques mène en premier lieu à une grande surface spécifique, propice aux réactions de surface de type échanges ioniques ou adsorption moléculaire présentés dans le paragraphe 2.3. De plus, ce caractère nanocristallin va souvent de pair avec la présence d'une couche hydratée en surface des nanocristaux [33], déjà présentée dans le paragraphe 1.1, qui témoigne aussi de l'immaturité des cristaux et de la forte réactivité de surface.

– **Sous-stœchiométrie** : l'existence de lacunes en sites Ca et OH et la présence associée d'anions bivalents HPO_4^{2-} et/ou CO_3^{2-} engendrent une moindre stabilité thermodynamique (§ 2.2). Ainsi, le choix du degré de non-stœchiométrie est un moyen de moduler sa solubilité, et donc sa résorbabilité *in vivo*.

– **Morphologie des cristaux** : dans l'os, l'apatite est constituée de nanocristaux présentant une forme allongée / plaquettaire. Une telle morphologie est particulièrement adaptée pour favoriser des réactions interfaciales avec les fluides environnants, en présentant une large surface de contact. De plus, dans les apatites biomimétiques de synthèse [34] comme dans l'os [38], des amas de nanocristaux orientés de façon parallèle semblent se former, pouvant jouer un rôle dans la physiologie osseuse.

– **Présence d'une couche ionique hydratée en surface des nanocristaux** : les ions contenus dans cette couche hydratée de surface sont particulièrement mobiles (ou « labiles »). Grâce à une diffusion ionique ainsi facilitée, ils peuvent prendre part dans la consolidation des apatites nanocristallines [85], où la mise en commun de couches de nanocristaux adjacents permet l'établissement d'un très grand nombre de joints de grain et une densification effective malgré des températures qui se doivent de rester « basses » (typiquement < 150 °C), pour ne pas altérer les nanocristaux.

La figure 3 illustre un nanocristal d'apatite osseuse ou son analogue de synthèse biomimétique, en interaction avec un milieu aqueux (ex : fluide biologique, milieu de précipitation...).

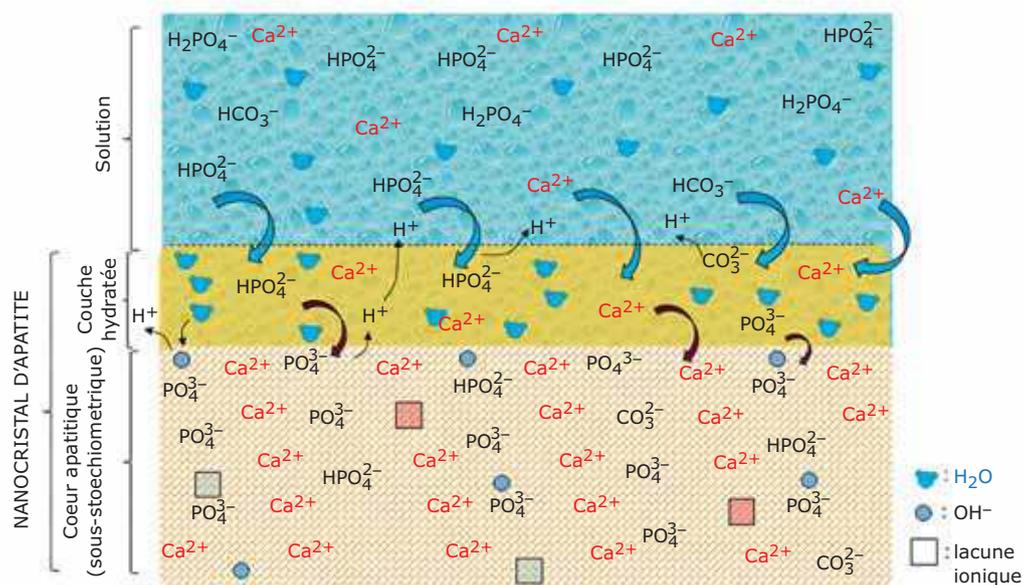
En fonction des propriétés requises, le développement des quatre caractéristiques listées ci-dessus peut être plus ou moins recherché. Le tableau 2 compare ainsi différents « degrés » de biomimétisme au minéral osseux (d'autres niveaux peuvent aussi exister, en considérant par exemple la présence d'autres ions tels que Mg^{2+} , Na^+ , des ions citrates, etc.). Ces différences sont cependant souvent ignorées ou sous-estimées dans la littérature scientifique ; pourtant, elles indiquent un degré de divergence plus ou moins grand avec l'apatite osseuse.

4. Préparation d'analogues de synthèse : apatites nanocristallines biomimétiques

Les apatites nanocristallines de synthèse présentent un intérêt indéniable pour élaborer des **substituts osseux bioactifs** en mettant à profit leur réactivité de surface ou encore pour disposer de nanocristaux d'apatite pour étudier finement la formation, l'évolution et les propriétés du minéral osseux dans des conditions simulant un contexte biologique normal ou pathologique. Par ailleurs, l'étude de ces cristaux nécessite des techniques de caractérisation complémentaires et la mise au point de méthodologies d'analyse adaptées à l'étude de ces apatites biomimétiques faiblement cristallisées et métastables.

4.1 Méthodes de synthèse

Contrairement à l'hydroxyapatite qui peut être synthétisée par diverses méthodes « haute » température (réaction solide-solide, voie hydrothermale, etc.) [86] [87], les apatites nanocristallines biomimétiques ne sont préparées qu'en solution (une mise en forme subséquente étant possible comme explicité plus loin). Les méthodes de synthèse sont principalement la précipitation par double décomposition ou encore l'hydrolyse d'un autre phosphate de calcium métastable. Le choix de la méthode va déterminer entre autres la quantité et



Le nanocristal se compose d'un cœur apatitique sous-stœchiométrique (lacunes en ions OH^- et Ca^{2+}) et d'une couche ionique hydratée de surface qui est en interaction avec la solution environnante.

Figure 3 – Schématisation d'un nanocristal d'apatite osseuse ou de son analogue de synthèse biomimétique, en interaction avec un milieu aqueux (ex : fluide biologique, milieu de précipitation...)

Tableau 2 – Mise en évidence de différents degrés croissants de biomimétisme au minéral osseux

Matériau	Propriété(s) imitée(s) du minéral osseux
Phosphates de calcium divers (ex : phosphates tricalciques, phosphate de calcium amorphe...)	Éléments chimiques
Hydroxyapatite (ex : revêtement plasma)	Éléments chimiques Structure cristalline
Apatite microcristalline non stœchiométrique	Éléments chimiques Structure cristalline Non-stœchiométrie/composition (HPO_4^{2-})
Hydroxyapatite nanocristalline	Éléments chimiques Structure Taille des cristaux
Apatite nanocristalline non stœchiométrique (non carbonatée)	Éléments chimiques Structure Taille des cristaux Non-stœchiométrie/composition (HPO_4^{2-}) Réactivité (couche ionique hydratée de surface)
Apatite nanocristalline non stœchiométrique carbonatée (cas représenté figure 3)	Éléments chimiques Structure Taille des cristaux Non-stœchiométrie/composition (HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} ...) Réactivité (couche ionique hydratée de surface)

le type de substitutions possibles. Outre l'intérêt d'une mise en œuvre à température modérée, ces méthodes de synthèse en solution offrent la possibilité de contrôler la composition chimique ainsi que les propriétés physiques, chimiques et biologiques de ces apatites. En effet les propriétés des apatites nanocristallines, en particulier leur vitesse de résorption et/ou leur réactivité, varient selon les conditions de synthèse [36] [88]. Deux principaux paramètres déterminent la cristallinité et la déficience en calcium des apatites synthétisées par des méthodes de précipitation : la température et le pH (de neutre à basique). La précipitation aux températures (80 à 100 °C) et pH les plus élevés favorisent la formation d'apatites moins lacunaires et mieux cristallisées.

Nous développons ici la principale voie de synthèse des apatites nanocristallines biomimétiques par **précipitation en milieu aqueux** à un pH proche du pH physiologique (pH ~ 7,4) et à température ambiante [88] [89] selon le protocole détaillé ci-après. Une apatite nanocristalline carbonatée peut être précipitée par exemple à partir d'une solution de phosphate et de carbonate (par exemple 40 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$] [20 g de NaHCO_3 et 1 mL d'ammoniaque concentré, puis ajustement à 500 mL d'eau désionisée] et d'une solution de calcium (17,7 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ dans 250 mL d'eau désionisée) [90]. La solution de calcium est versée rapidement dans la solution de phosphate et carbonate à température ambiante et sous agitation pendant quelques secondes. Le précipité ainsi formé, éventuellement mûri, est ensuite filtré puis lavé. Le gel d'apatite récupéré est ensuite lyophilisé puis la poudre obtenue est stockée au congélateur afin d'éviter toute évolution des nanocristaux [91]. Le processus de maturation de l'apatite biomimétique est particulièrement intéressant à considérer pour mieux appréhender l'évolution de la composition, de la structure et des propriétés physico-chimiques des apatites biologiques et synthétiques. La teneur en carbonate peut également être modulée en faisant varier la quantité de précurseur carbonaté, et la carbonatation a également tendance à augmenter avec le temps de maturation en milieu carbonaté (comme pour le minéral osseux, de plus en plus carbonaté lorsqu'il devient plus mature).

Des apatites nanocristallines non carbonatées peuvent également être synthétisées selon cette même méthode mais en absence d'ions carbonate. D'autres protocoles impliquant des solutions cationiques et anioniques avec des rapports Ca/P légèrement différents peuvent aussi être proposés. Dans tous les cas, un large excès d'ions phosphate permet de tamponner le milieu de précipitation à un pH proche de la valeur physiologique.

L'influence des paramètres de la synthèse sur les caractéristiques physico-chimiques des apatites obtenues a été peu reportée dans la littérature. Cependant, le choix de ces paramètres peut être crucial, compte tenu du caractère non stœchiométrique, hydraté et nanocristallin des apatites biomimétiques. Par exemple, des échantillons préparés par neutralisation de l'acide phosphorique (H_3PO_4) par l'hydroxyde de calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) à différentes températures ont montré des degrés de cristallinité et d'hydratation variables [92]. L'impact du pH et du temps de maturation en solution a également été mis en évidence [33] [93]. L'influence de nombreux paramètres de synthèse tels que le temps de maturation, la température, le pH et la nature des sels de phosphate a été étudiée par N. Vandecastelaère [33]. Il a montré que l'ensemble de ces paramètres impacte significativement les caractéristiques physico-chimiques des apatites précipitées. Il a également montré que les conditions de post-traitement (ré-immersion, traitement thermique, mise en forme) peuvent modifier significativement les caractéristiques finales des biocéramiques à base d'apatites biomimétiques.

La précipitation d'apatites nanocristallines en **milieu hydro-alcoolique** a aussi été explorée ponctuellement, et permet de moduler le contenu en ions hydrogénophosphate et carbonate [94] [95] [96]. En effet l'éthanol, de constante diélectrique plus faible que l'eau, modifie les interactions entre les ions du précurseur amorphe précipité et les molécules d'eau de solvation. De plus, diverses études ont montré l'effet du procédé et de la température de séchage sur la composition, la structure et le degré de cristallinité de l'apatite phosphocalcique [96] [97].

Enfin, le **dopage** d'apatites nanocristallines a également été reporté dans la littérature afin de leur conférer des propriétés additionnelles. Par exemple, l'enrichissement d'apatites nanocristallines notamment avec des cations aux propriétés antimicrobiennes Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ est possible avec des taux de dopage limites qui ont été évalués [98]. Le zinc et le cuivre semblent agir en tant qu'inhibiteurs de la croissance cristalline de l'apatite alors que l'argent ne modifie pas significativement le processus de formation et croissance des nanocristaux. Il est également possible de réaliser un enrichissement ionique ciblant plutôt la surface des nanocristaux par le biais d'échanges ioniques [55] (la quantité d'ions dopants pouvant cependant évoluer dans le temps en fonction du phénomène de maturation).

Les apatites biomimétiques peuvent également être synthétisées à partir de l'hydrolyse en milieu aqueux d'un phosphate de calcium plus soluble comme par exemple le phosphate de calcium amorphe, les phosphates dicalciques (dihydraté ou anhydre), le phosphate octocalcique ou le phosphate tricalcique alpha. L'hydrolyse de ces phosphates de calcium peut conduire à l'apatite par un mécanisme de dissolution-reprécipitation en fonction du pH, de la température et de la présence d'autres ions qui peuvent agir comme des inhibiteurs (ex : Mg^{2+} , CO_3^{2-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) ou des promoteurs (ex : F^-) de l'hydrolyse par exemple du phosphate dicalcique dihydraté ou du phosphate octocalcique [99].

Des apatites biomimétiques peuvent également être obtenues par d'autres méthodes plus marginales, par exemple à partir de **fluide biologique simulé SBF** (*Simulated Body Fluid*) reproduisant plus ou moins finement la composition minérale du plasma sanguin, voire avec du SBF concentré obtenu en multipliant l'ensemble des concentrations afin d'augmenter la sursaturation vis-à-vis de la précipitation d'apatite [100]. Une autre voie de synthèse envisagée utilise la thermo-décomplexation d'un chélate de calcium en milieu phosphaté, par exemple en partant de citrate de calcium à basse température (quelques °C) connu pour se décomplexer en libérant des ions Ca^{2+} par augmentation de température [101].

4.2 Techniques de caractérisation adaptées à l'étude des apatites biomimétiques

Les apatites biomimétiques au minéral osseux étant des composés nanocristallins, lacunaires, et hydratés, les techniques de caractérisation et les méthodes employées pour la préparation éventuelle des échantillons doivent être adaptées à l'étude de ces composés métastables et thermiquement altérables.

Plusieurs techniques complémentaires de caractérisation peuvent être utilisées, dont les principales sont listées dans le tableau 3 [102]. On peut distinguer les méthodes spectroscopiques

Tableau 3 – Principales techniques de caractérisation pour l'étude des phosphates de calcium apatitiques, en particulier des apatites biomimétiques [102]

Approche analytique	Techniques	Méthodologies
Analyses de composition chimique	Dosage des ions calcium et divers autres cations	Complexométrie (ex : avec EDTA) Absorption atomique Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP) Chromatographie ionique...
	Dosage des ions phosphates (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-})	Colorimétrie
	Dosage des ions carbonates (CO_3^{2-})	Coulométrie Spectroscopie infrarouge (FTIR)
Diffraction	Diffraction des rayons X (DRX)	
Résonance magnétique nucléaire	RMN du solide	
Résonance paramagnétique électronique	RPE	
Spectroscopie de photoélectrons X	XPS	
Techniques d'analyse par faisceaux de particules	PIXE EELS Diffusion inélastique de neutrons...	
Analyses thermiques	Thermogravimétrie (ATG) Analyse thermique différentielle (ATD) Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	
Spectroscopies vibrationnelles	Spectroscopie infrarouge (FTIR)	Transmission Réflexion totale atténuée (ATR) Microspectroscopie IR
	Spectroscopie Raman	Spectroscopie Raman Microscopie Raman confocale
Microscopies	Microscopie à force atomique (AFM)	
	Microscopies électroniques	Microscopie électronique à balayage (MEB) Microscopie électronique en transmission (MET) Mode cryogénique

PIXE *Particle Induced Xray Emission*
EELS *Electron Energy loss Spectroscopy*

piques qui informent sur les environnements chimiques locaux, des autres techniques plus générales d'analyse.

Les caractéristiques physico-chimiques, structurales et morphologiques particulières des apatites nanocristallines ont été explorées en détail ces dernières années, grâce notamment aux évolutions technologiques des techniques de caractérisation. De plus, la possibilité de préparer des analogues de synthèse biomimétiques permet leur utilisation comme modèles du minéral osseux plus ou moins mature (remplaçant ainsi l'hydroxyapatite stœchiométrique souvent utilisée mais moins appropriée).

4.2.1 Techniques spectroscopiques

De nombreuses techniques spectroscopiques ont été appliquées à la caractérisation des apatites biologiques et à leurs analogues de synthèse. Celles-ci peuvent être simples et aisément accessibles comme les spectroscopies vibrationnelles ou plus sophistiquées comme la résonance magnétique nucléaire (RMN), la résonance paramagnétique électronique (RPE) [103], la spectroscopie de photoélectrons X (XPS) [104] [105]

ou celles impliquant des faisceaux de particules (PIXE, EELS, diffusion inélastique de neutrons...) [106] [107]. L'une des difficultés d'analyse est l'instabilité intrinsèque des apatites biomimétiques, dont la structure peut être modifiée par une simple déshydratation. Les techniques impliquant une forte dispersion d'énergie au niveau de l'échantillon sont à utiliser avec de grandes précautions. Les altérations liées à l'utilisation de faisceaux d'électrons par exemple ont été relevées [108].

4.2.1.1 Spectroscopie infrarouge

Cette méthode de caractérisation est l'une des plus anciennes à avoir été appliquée aux apatites biologiques. Elle a mis en évidence la présence de différents environnements des ions carbonate dans ces apatites [109] et permet de visualiser des ions moléculaires tels que OH^- , PO_4^{3-} ou HPO_4^{2-} [110] [111]. L'avènement de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, FTIR, a permis d'améliorer de manière conséquente la qualité des spectres et l'interprétation de raies spectrales de faible intensité ou d'épaulements.

Ainsi, les différences de spectre entre les apatites bien cristallisées synthétiques et celles de biominéraux apatitiques ou de leurs homologues de synthèse ont permis de mettre en évidence l'existence, dans ces dernières, d'environnements non apatitiques de certains ions moléculaires comme les ions carbonate CO_3^{2-} ou hydrogénophosphate HPO_4^{2-} , qui n'existent pas dans les apatites bien cristallisées [11] [12] [13] [27] [112] [113] [114] [115]. Par exemple, les caractéristiques connues des environnements chimiques non apatitiques apparaissant dans le domaine de vibration $\nu_4(\text{PO}_4)$ sont reportées sur la figure 2a. La détermination quantitative de la proportion de ces environnements reste cependant difficile et exige l'utilisation de techniques de traitements des spectres (déconvolution, décomposition). Quelques exemples sont donnés figure 2. Par ailleurs, le rapport d'intensité de deux raies spectrales même lorsqu'elles correspondent à la même espèce chimique (hydrogénophosphate par exemple) dans des environnements différents (intra-structural ou non apatitique par exemple) ne peut théoriquement pas être confondu avec un rapport molaire de ces espèces car les coefficients d'extinction molaires peuvent différer. Une détermination des rapports molaires nécessite donc l'utilisation de courbes d'étalonnage et celles-ci sont souvent difficiles à réaliser [116].

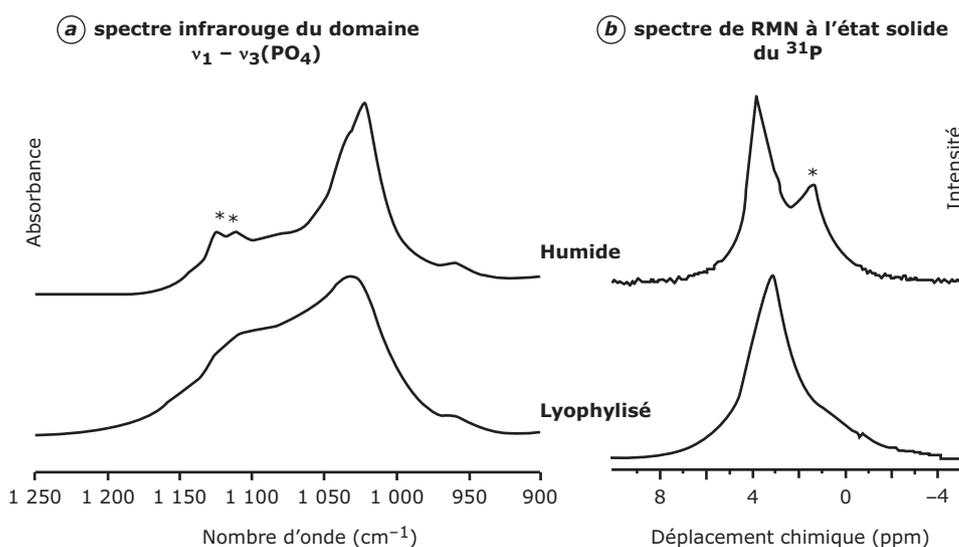
La spectroscopie infrarouge a également mis en évidence la fragilité des structures liées à la couche hydratée des apatites biomimétiques (figure 4a) en suivant l'effet du séchage [117].

4.2.1.2 Spectroscopie Raman

Complémentaire de la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman révèle également l'existence d'environnements non apatitiques dans les apatites nanocristallines [15]. Elle peut cependant parfois conduire à des altérations des échantillons en relation avec l'énergie dispersée par la source Laser. Elle permet néanmoins la réalisation de cartographies beaucoup plus détaillées que celles qui peuvent être obtenues par infrarouge [118]. De plus, l'analyse par spectroscopie Raman peut être réalisée directement en milieu aqueux, contrairement à l'analyse IR où l'absorption de l'eau est très significative.

4.2.1.3 RMN du solide

Cette technique apporte des informations sur l'environnement d'atomes pourvus d'un spin nucléaire. Elle a été utilisée pour caractériser divers ions minéraux et leurs environnements dans les biominéraux apatitiques ou leurs analogues de synthèse (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , F^- , OH^- , CO_3^{2-} , Na^+ , Ca^{2+}) [119] [120] [121] [122] [123] [124] [125]. Elle est très riche en informations mais nécessite des quantités d'échantillons plus importantes (notamment en fonction de l'abondance naturelle du noyau étudié actif en RMN) que les techniques vibrationnelles précédemment présentées, et elle n'est pas très adaptée à l'imagerie de solides minéraux [126]. La RMN du solide a permis, par différentes approches, de confirmer l'existence d'environnements chimiques non apatitiques et la réalité de la couche hydratée (figure 4b) [39] [127] [128] [129]. Les résultats obtenus permettent de quantifier ces environne-



Dans les deux cas, on observe à l'état humide des pics plus fins et mieux définis qu'après lyophilisation. Cette meilleure résolution est attribuée à l'effet structurant de l'eau sur la couche hydratée. Son élimination se traduit par une « amorphisation » responsable de l'élargissement des raies. Sur les spectres de RMN, on note que la bande attribuée aux ions HPO_4^{2-} vers 1,7 ppm (*), est considérablement élargie après séchage et n'apparaît plus que comme une dissymétrie sur le pic principal des PO_4^{3-} (vers 3 ppm). Cette « amorphisation » concerne donc essentiellement la couche hydratée riche en ions HPO_4^{2-} . La même observation, plus ténue, peut être faite sur les spectres infrarouge où deux bandes. (*) attribuables aux ions HPO_4^{2-} sont affectées.

Figure 4 – Effet du séchage sur l'organisation des apatites biomimétiques nanocristallines (échantillon non carbonaté mûré 10 minutes). Observation par FTIR en transmission et RMN du solide du ^{31}P [117]

ments. Il faut remarquer toutefois que dans les quelques cas où des évaluations ont été effectuées par spectroscopies FTIR et RMN du solide, notamment pour les ions OH^- , des différences existent qui ne semblent pas encore avoir été clarifiées. La RMN, comme la spectroscopie infrarouge, révèle en outre la fragilité de la couche hydratée (figure 4) [117].

4.2.2 Autres techniques

D'autres méthodes de caractérisation sont également nécessaires à l'analyse complète des apatites biomimétiques (tableau 3). Contrairement à l'hydroxyapatite stœchiométrique, les apatites biologiques ou leurs analogues de synthèse présentent une morphologie allongée dans le sens de l'axe c (typiquement en plaquettes ou « lamelles ») observable par **microscopie électronique**. Cependant, l'exposition au faisceau peut significativement endommager les nanocristaux, lesquels peuvent évoluer en temps réel pendant l'analyse. Aussi, l'utilisation de méthodes cryogéniques est à conseiller [34]. Les cristaux constitutifs sont de taille nanométrique [130] [131], contrairement à la taille micronique des cristaux d'hydroxyapatite.

La **diffraction des rayons X (DRX)** est utilisée pour vérifier la **pureté** des apatites et étudier leur **crystallinité**, laquelle dépend à la fois de la taille des cristallites et du désordre cristallin dans la maille. Le taux de cristallinité de ces apatites est plus faible que celui de l'hydroxyapatite stœchiométrique ; il se rapproche de celui de l'os (figure 5) et dépend de la maturation. Bien que la faible résolution des raies de DRX des apatites biomimétiques ne rende pas possible la détermination des dimensions des paramètres de la maille de façon précise, la dimension apparente des domaines apatitiques peut, quant à elle, être estimée grâce à la mesure de la largeur à mi-hauteur des raies en appliquant par exemple la formule de Scherrer [132] qui néglige les élargissements de raies dus aux désordres de distributions atomiques inhérents aux substitutions ioniques et lacunes dans le réseau cristallin

(microcontraintes). La taille des cristallites est d'ordre nanométrique. Il est important de noter que ce bas taux de cristallinité est comparable à celui observé pour les apatites biologiques de l'os ou de la dentine. C'est un critère supplémentaire qui permet de considérer les apatites nanocristallines synthétiques comme des « modèles » adaptés à la représentation du minéral osseux, contrairement à l'hydroxyapatite stœchiométrique bien cristallisée dont les caractéristiques sont plus proches de celles de l'émail dentaire [131] [133]. L'analyse par DRX ne renseigne cependant que sur le cœur apatitique (souvent sous-stœchiométrique), alors que les caractéristiques de la couche de surface non apatitique ne sont pas accessibles par cette technique en raison de son absence de cristallinité ; l'exploration de cette couche étant plus adaptée par l'utilisation de sondes locales de type spectroscopies comme décrit précédemment.

D'un point de vue chimique, la **composition des apatites nanocristallines** diffère également de celle de l'hydroxyapatite. Plusieurs méthodes d'analyses permettent de mesurer avec une bonne précision les concentrations en ions calcium, phosphate total et carbonate. Toutes ces méthodes nécessitent au préalable la dissolution de la poudre apatitique en milieu acide avant l'analyse (pour les ions calcium et orthophosphate) ou pendant l'analyse (pour les ions carbonate). Les concentrations en ions calcium et phosphate (PO_4^{3-} et HPO_4^{2-}) sont mesurables par exemple par **complexométrie** en retour avec le sel disodique de l'éthylène diamine tétraacétique (EDTA) comme agent complexant ou par **spectrophotométrie UV** d'un complexe phosphovanadomolybdique en milieu acide [134]. L'incertitude de mesure sur les teneurs en calcium et en phosphore est de l'ordre de 0,5 % en masse. Le rapport Ca/P est alors calculé pour caractériser la non-stœchiométrie des échantillons apatitiques (ou le rapport Ca/(P + C) si l'apatite est carbonatée). Des méthodes alternatives peuvent être utilisées, comme l'**ICP** ou l'**absorption atomique**, mais des effets matrices en particulier avec les ions

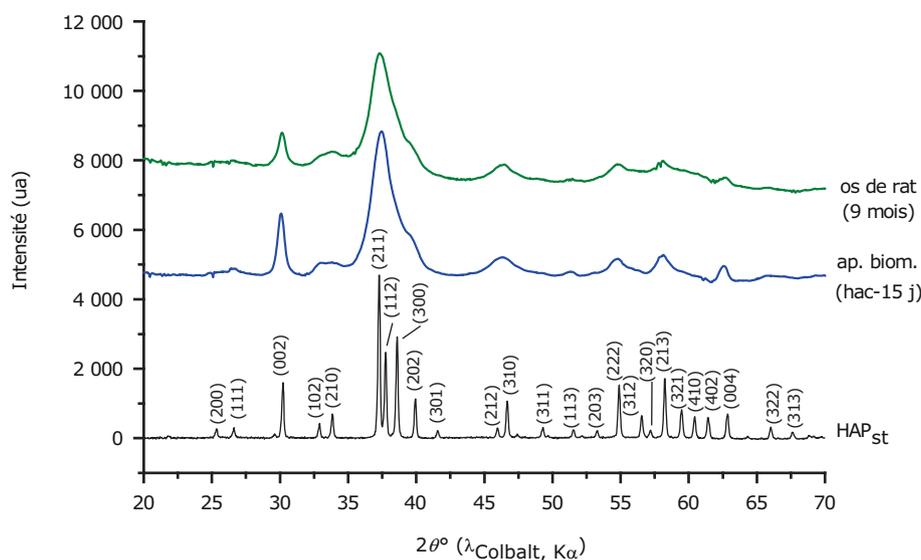
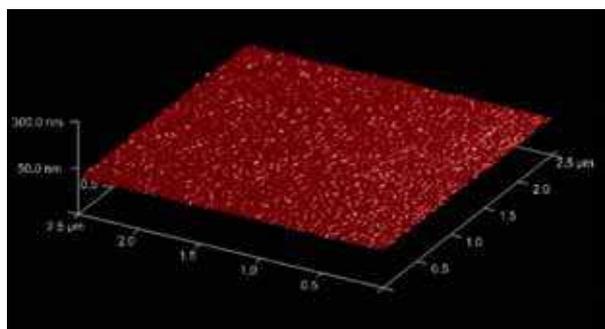
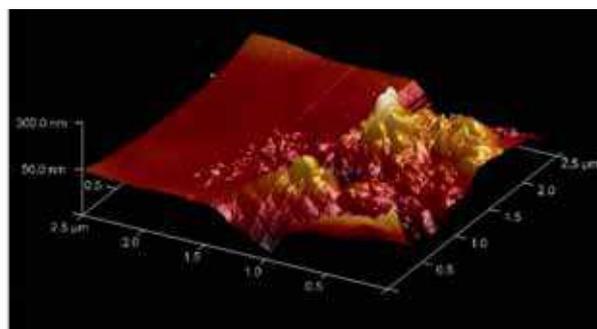


Figure 5 - Exemple de diffractogramme des rayons X d'une apatite biomimétique carbonatée (maturée 15 jours en solution à température ambiante) et d'une hydroxyapatite stœchiométrique (calcinée à 1 000 °C), en comparaison avec un os de rat (9 mois)

(a) SCP non minéralisé



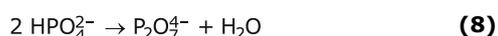
(b) SCP-HA en cours de minéralisation



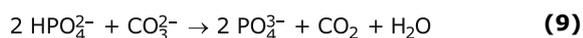
Suivi de la biominéralisation de peptide apparenté au collagène SCP (*Synthetic Collagen Peptide*), permettant l'observation du front de minéralisation de l'hydroxyapatite HA.

Figure 6 – Exemple d'analyse AFM [223]

phosphates et la présence d'autres ions dans le milieu peuvent altérer les mesures. La teneur en ions HPO_4^{2-} est obtenue par **méthode indirecte** basée sur la condensation des ions HPO_4^{2-} en ions pyrophosphates $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ après calcination des poudres (3 h à 500 °C ou 20 min à 600 °C) [135], selon l'équation :



Comme ces ions pyrophosphate ne peuvent pas former de complexe phosphovanadomolybdique, la teneur en ions HPO_4^{2-} est alors obtenue par comparaison avec les résultats du dosage sans traitement thermique. Cependant cette méthode ne peut pas être utilisée pour quantifier précisément la teneur en ions HPO_4^{2-} contenue dans l'os et autres apatites carbonatées en raison de la présence d'ions carbonate susceptibles de perturber la formation des ions pyrophosphate par des réactions parallèles du type :



La quantité d'ions carbonate présents dans les apatites peut être déterminée par **titrage coulométrique** basé sur la mesure du CO_2 libéré pendant la dissolution de l'échantillon en conditions acides [136], ou encore par **dosage du carbone total**. Une méthodologie a aussi été mise au point pour quantifier les carbonates à partir du **spectre infrarouge** [137], revisitant de précédentes études de quantification [138]. Cette méthode ne nécessite pas de préparation particulière de l'échantillon ni des quantités importantes de produit et peut aussi s'appliquer pour l'analyse de revêtements.

Le rapport $\text{Ca}/(\text{P} + \text{C})$ est alors calculé pour caractériser la non-stœchiométrie des apatites carbonatées. Il faut noter que, en plus des ions calcium, phosphate, carbonate et hydroxyde, des « traces » d'autres substituants ioniques sont également présentes dans les apatites biologiques (par exemple Na^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} ...). Leur faible teneur est alors déterminée par des techniques adaptées telles que l'ICP ou l'absorption atomique.

Un intérêt particulier est porté à la **caractérisation de l'état de surface** des apatites nanocristallines, qui implique la couche ionique hydratée de surface de nature non apatitique ; la présence de cette couche joue un rôle déterminant

dans la réactivité de surface du minéral osseux et des biomatériaux synthétiques à base d'apatites nanocristallines. Des techniques d'analyse de surface peuvent alors être utilisées en complément des approches spectroscopiques. Parmi ces techniques, la **microscopie à force atomique (AFM)** est une technique d'imagerie à balayage de sonde qui permet de visualiser la topographie de surface d'un échantillon à l'échelle atomique sous air ou sous vide, et permet également une analyse en milieu liquide [139], permettant notamment l'observation d'apatites biologiques [140] [141] [142] (Figure 6) [223]. Les propriétés de surface de revêtements d'apatites nanocristallines comme la rugosité, la porosité ou encore des mesures d'épaisseur peuvent également être déterminées par cette technique [143]. Elle permet enfin d'explorer les interactions entre des surfaces d'apatites biologiques ou synthétiques et des biomolécules ou ions d'intérêt biologique [140] [144] [145] [146].

5. Applications biomédicales

Le caractère bio-inspiré des apatites biomimétiques et leur forte réactivité de surface en font d'excellentes candidates pour des applications biomédicales, et ce non seulement pour la régénération osseuse mais aussi, comme cela a été montré plus récemment, dans d'autres domaines de la « nanomédecine » que ce soit dans un but thérapeutique ou de diagnostic.

5.1 Biomatériaux à base d'apatite biomimétique pour la réparation osseuse

Compte tenu de leur similitude avec le minéral osseux, les apatites nanocristallines biomimétiques trouvent incontestablement une place de choix pour le développement de biomatériaux osseux, qu'il s'agisse de matériaux sous forme de poudres, de matrices denses ou poreuses (*scaffold*), ou encore de ciments, de composites ou de revêtements.

5.1.1 Poudres/précurseurs

Pour ces applications, les apatites biomimétiques peuvent être formées directement *in situ* (par la voie des ciments ou certaines méthodologies de revêtements, par exemple), ou encore être formées préalablement pour être ensuite mises en forme. Lorsqu'une précipitation préalable est envisagée, il est courant de sécher (éventuellement par lyophilisation pour limiter l'altération des nanocristaux, voire par agglomération-séchage ou « atomisation ») le précipité afin d'obtenir une poudre qui sert alors de précurseur à la génération du biomatériau final. En absence de séchage, le précipité lavé d'apatite peut également être utilisé comme précurseur menant à l'obtention de blocs céramiques.

Différentes voies de mises en forme de ces poudres ou gels d'apatites biomimétiques sont décrites ci-après.

5.1.2 Matrices denses et poreuses

Comme indiqué précédemment, la réactivité des apatites biomimétiques provient en grande partie de la présence en surface des nanocristaux d'une couche hydratée. Néanmoins, compte tenu de la relative fragilité de cette couche et du caractère métastable lié à la non-stœchiométrie, l'élaboration de biocéramiques traditionnelles à partir de telles apatites, par frittage conventionnel mettant en jeu des températures élevées, mène à des modifications importantes et irréversibles de leurs caractéristiques physico-chimiques. La mise au point de biocéramiques à partir d'apatite biomimétique (biocompatibles, résorbables et présentant une forte bioactivité) nécessite donc le développement de procédés de consolidation à « basse température » tels que le séchage de gel, la voie des ciments, la consolidation sous charge à froid ou encore le frittage flash SPS (*Spark Plasma Sintering*) utilisé spécifiquement à basse température (typiquement de l'ordre de 150 °C) [85].

Par exemple, des blocs céramiques peuvent être préparés par **séchage de gel** obtenu à partir de la synthèse d'apatite décrite précédemment. Le gâteau de filtration filtré et lavé peut en effet être redispersé avec une forte agitation et, durant cette étape, différents composés peuvent être ajoutés (ex : caséine, albumine, ou encore gélatine). La suspension épaisse ainsi obtenue peut alors être déposée dans des moules en téflon, et séchée très lentement (typiquement 3 semaines pour des échantillons de volume initial de

50 cm³). Cette faible vitesse permet de limiter l'apparition de fissures [147]. Une autre voie, utilisant **diverses formulations de ciments** phospho-calciques, peut aussi être utilisée (§ 5.1.3), ou encore la consolidation/le frittage **sous charge à froid** de poudres d'apatite nanocristalline. Cependant, les échantillons obtenus par l'une de ces trois voies présentent, lorsqu'ils ne sont pas associés à des polymères, des propriétés mécaniques limitées (module d'Young < 25 GPa, par exemple [147]).

Depuis le milieu des années 2000, une nouvelle approche utilisant la consolidation à basse température par **frittage flash SPS** (*Spark Plasma Sintering*) **SPS** a été explorée [85] [148] [149]. Grâce à une méthode de chauffage non conventionnelle basée sur le passage d'un courant électrique à travers une matrice conductrice, et à la présence de la couche ionique hydratée des nanocristaux permettant une diffusion ionique facilitée, il est en effet possible de consolider des apatites nanocristallines par SPS typiquement sous 100 MPa et 150 °C pendant quelques minutes. Les pièces céramiques obtenues s'avèrent présenter des propriétés mécaniques notables, avec par exemple des valeurs de contrainte à la rupture en flexion 3 points de l'ordre de 10-20 MPa (échantillons de taille 30 × 3,5 × 4,1 mm³) pour des matériaux présentant 26 % de porosité totale [85], et un module d'Young pouvant atteindre ~ 40 GPa.

Les principales propriétés obtenues avec ces différents procédés d'élaboration sont résumées dans le tableau 4 [152] [153].

Afin d'améliorer encore les propriétés mécaniques des matériaux consolidés, notamment pour des utilisations en site osseux porteurs, plusieurs solutions peuvent être envisagées. Il est en particulier possible de conférer un renforcement de l'apatite avec d'autres matériaux dont les polymères. L'apatite biomimétique doit cependant rester la base de ce matériau composite pour conserver les propriétés biologiques initiales. L'élaboration par SPS de composite à matrice céramique d'apatite biomimétique et renforcement polymère (cellulose microcristalline MCC) a été récemment développée [150]. Les pastilles obtenues avec 10 % en masse de fibres de cellulose ont permis de doubler la résistance mécanique en compression diamétrale. Par ailleurs, Jacquart et al. ont montré qu'une teneur minimale en carboxyméthylcellulose (CMC) était

Tableau 4 – Comparaison des principales propriétés de biocéramiques obtenues par différents procédés de mise en forme [152] [153]

Méthode	Association avec des principes actifs	Porosité totale	Résistance en compression (MPa)	Décomposition	Commentaire
Ciments	+/-	50 à 90 %	~3 à 60	Non	Lent Pas de changement de tailles cristallines
Séchage de gel	+	35 %	40 à 70	Non	Lent Pas de changement de tailles cristallines
Consolidation/Frittage sous charge	-	40 à 50 %	90 à 120	Faible	Montée et descente rapides
SPS à basse température (ex : 150 °C)	-	20 à 30 %	-	Faible	Montée et descente rapides
Référence : os cortical			88 à 164		

Tableau 5 – Exemples de compositions de ciments phosphocalciques biomimétiques classés en fonction de leur type de réaction chimique de prise

Composition	Produit final	Références
Ciments de type « acide-base »		
TTCP + DCPD	Hydroxyapatite (<i>Bonesource</i> ®)	[154]
CaCO ₃ + MCPM + α-TCP	Apatite carbonatée (<i>SRS</i> ®)	[155]
TTCP + H ₃ PO ₄ + α-TCP	Apatite nanocristalline (<i>Cementek</i> ®)	[156]
Ca(OH) ₂ ou TTCP + OCP	Apatite nanocristalline	[157]
DCPD + CaCO ₃ (vatérite)	Apatite nanocristalline carbonatée + CaCO ₃ vatérite	[158]
Ciments de type monocomposant		
Phosphate de calcium amorphe (ACP)	Apatite carbonatée (<i>Biobon</i> ® and α- <i>BSM</i> ®)	[159]
α-TCP		[160] [161] [162]
Ciment à base d'une phase hydrolysable (ciments brushitiques)		
β-TCP + MCPM	DCPD se transforme en apatite nanocristalline	[165]
DCPD : dicalcium phosphate dihydrate MCPM : monocalcium phosphate monohydrate OCP : octacalcium phosphate TCP : tricalcium phosphate TTCP : tétracalciumphosphate		

nécessaire (10 à 20 % m/m de CMC dans la phase solide du ciment) pour significativement améliorer les propriétés mécaniques de ciments à base d'apatite biomimétique une fois durcis et secs [151].

5.1.3 Ciments à base d'apatites biomimétiques

Les ciments phosphocalciques se sont considérablement développés depuis les années 1980 en tant que biomatériaux de comblement ou de renforcement osseux, que ce soit sous forme de pâte moulée placée dans le site osseux à combler par exemple à l'aide d'une spatule, ou bien sous forme d'une pâte injectable implantée à l'aide d'une seringue équipée d'un *trocart* [N4950]. Le principe de ces ciments est basé sur la capacité des phases de phosphate de calcium constituant la phase solide du ciment à réagir pour former une apatite phosphocalcique, plus ou moins bien cristallisée, en présence d'un milieu aqueux (phase liquide du ciment et fluides biologiques). On peut distinguer plusieurs types de ciments selon le type de réaction chimique de prise impliquée. Les formulations de base de ces différents types de ciments sont reportées dans le tableau 5 ; elles peuvent cependant évoluer notamment par l'ajout d'additifs afin d'améliorer certaines propriétés ou d'en conférer de nouvelles.

De nombreuses formulations de ciments ont été proposées et sont commercialisées pour certaines depuis de nombreuses années : *Norian*® *SRS*, *Bonesource*®, *Cementek*®, *Biobon*®, α-*BSM*®. Il est fort probable que les interactions entre la surface des nanocristaux d'apatite biomimétique formés soient responsables du durcissement et de la cohésion du ciment.

5.1.3.1 Ciments de type « acide-base »

La plupart des ciments à base d'apatites font l'objet d'une réaction entre un ou plusieurs sels de calcium « basiques », riches en calcium comme Ca(OH)₂, CaCO₃ ou le phosphate tétracalcique (TTCP, Ca₄(PO₄)₂), et un ou plusieurs phosphates de calcium « acides » c'est-à-dire riches en phosphate comme le phosphate monocalcique monohydraté (MCPM, Ca(H₂PO₄)₂, H₂O), l'acide phosphorique H₃PO₄ ou le phosphate dicalcique dihydraté (DCPD, CaHPO₄, 2H₂O),

(tableau 5). La réaction conduit à la formation d'une nouvelle phase de phosphate de calcium moins soluble comme l'apatite dont la cristallisation provoque la prise du ciment. La réaction de prise est souvent complexe et difficile à contrôler sachant que chaque sel réactif impliqué dans la réaction peut s'hydrolyser séparément en apatite milieu aqueux. L'ensemble de ces réactions peut engendrer des variations de pH plus ou moins importantes durant la réaction chimique de prise du ciment ainsi que la formation de phases intermédiaires comme le DCPD ou l'OCP [156]. D'un point de vue thermodynamique, la réaction acide-base est toujours exothermique bien que la libération de chaleur soit généralement très en deçà de celle rencontrée lors de l'utilisation de ciments osseux acryliques à base de poly-méthacrylate de méthyle [163].

Des ciments biphasiques (ciments mixtes de phosphate et de carbonate de calcium) ont été proposés en vue de contrôler les propriétés de résorption du ciment. En fonction du rapport initial carbonate/phosphate, ces ciments peuvent conduire à une apatite nanocristalline hautement carbonatée (environ 10 % m/m de CO₃) analogue au minéral osseux associée à une phase métastable de carbonate de calcium de type vatérite ou non [158] [164].

5.1.3.2 Ciments de type monocomposant

Le second type de ciments (tableau 5) implique une réaction chimique de prise mettant à profit la métastabilité d'une phase de phosphate de calcium en milieu aqueux et sa rapide transformation en apatite par une réaction d'hydrolyse : deux phases métastables telles que le **phosphate tricalcique alpha (α-TCP)** ou le **phosphate de calcium amorphe (ACP)** peuvent être utilisées car elles conduisent à des temps de prise rapides à température physiologique, du fait de leur vitesse élevée de transformation/d'hydrolyse en apatite à 37 °C [159] [160]. Ce type de ciments implique des variations de pH plus modérées que dans le cas des ciments de type acide-base. La température est en général le paramètre déterminant pour la vitesse de la réaction de transformation/hydrolyse.

5.1.3.3 Ciments à base d'une phase hydrolysable (ciments brushitiques)

Enfin, un troisième type de ciments peut être distingué ; il repose sur la formation pendant la réaction chimique de prise du ciment d'une phase métastable dans les conditions physiologiques, telle que la brushite (DCPD), qui une fois implantée *in vivo* est transformée plus ou moins rapidement en apatite par une réaction d'hydrolyse : on parle alors de ciments brushitiques [165]. Néanmoins, la réaction de prise correspond au type de celles rencontrées pour les ciments de type « acide-base ».

Parmi les principaux paramètres critiques pour la prise d'un ciment apatitique (quel que soit son type, tableau 5), on peut citer :

- la taille des particules réactives ;
- le rapport liquide sur solide (L/S) ;
- le temps de prise ;
- l'injectabilité ;
- la cohésion de pâte ;
- la porosité ;
- les propriétés mécaniques du ciment.

Pour plus de détails sur ces aspects, se reporter à l'article [N4950].

5.1.4 Composites

L'association d'un composé organique (polymère, par exemple) à une apatite peut être un moyen de moduler les propriétés d'un biomatériau, et permettre notamment d'obtenir des systèmes présentant à la fois une porosité adaptée, une bonne résistance mécanique et un caractère biodégradable, tout en ayant des propriétés biologiques adéquates. D'ailleurs, ce type de systèmes composites minéral/organique se trouve dans la nature dans l'os où les nanocristaux d'apatite viennent combler des interstices laissés par les fibrilles de collagène [166].

Des systèmes composites associant divers polymères à des particules d'apatites de dimensions nanométriques ont ainsi été étudiés, essentiellement depuis les années 2000, démontrant un engouement croissant pour cette thématique (voir par exemple la revue [167]). Parmi les systèmes étudiés, on peut citer par exemple l'association d'apatite nanométrique avec divers (bio)polymères tels que :

- du collagène [168] [169] [170] [171] ;
- de la soie [172] ;
- du chitosane [173] [174] ;
- de l'acide polylactique PLA ou polylactique/glycolique PLGA [175] [176] [177] [178] [179] ;
- de la cellulose [150] [180] [181] ;
- de l'alcool polyvinylique ou PVA [182] ;
- du poly-ε-caprolactone ou PCL [183] ;
- divers polyamides [184] [185].

Des composites présentant une architecture poreuse interconnectée modulable et des propriétés mécaniques proches de celles de l'os naturel (os spongieux, par exemple) ont ainsi pu être obtenues. La porosité est en effet un caractère souvent recherché pour la régénération osseuse, afin d'augmenter la colonisation cellulaire et la surface d'échange entre la matrice et les fluides environnants. La porosité peut être générée par exemple par l'ajout d'agent porogène soluble [182] ou encore par génération de mousse au CO₂ supercritique [186].

Les polymères et l'apatite peuvent être associés selon différentes modalités, telles que la précipitation d'apatite sur fibres

polymères préalablement mises en suspension, ou en faisant prendre en masse le polymère dans une suspension de particules apatitiques, ou encore par mélange solide/solide. Le polymère peut quant à lui être sous forme de fibres (par exemple obtenues par électrofilage ou *electrospinning*) ou encore de réseau tridimensionnel réticulé (*cross-linking*). Il est également possible d'associer le polymère au moment de la consolidation de l'apatite, ce qui a été réalisé récemment par frittage flash à « basse » température comme mentionnée ci-dessus (§ 5.1.2) [150]. Récemment la faisabilité de l'élaboration d'un matériau composite à base de PLGA et d'apatite biomimétique carbonatée par *freeze-casting* (mise en forme par refroidissement contrôlé) en utilisant du diméthyl carbonate comme solvant a été démontrée et a permis d'obtenir des scaffolds poreux sans observer de retrait significatif [179].

Dans de tels composites minéral/organique, une dégradation plus rapide du polymère par rapport à l'apatite peut cependant survenir pour certains systèmes et être à l'origine de modifications physico-chimiques et du comportement biologique du matériau dans le temps post-implantation. Ce paramètre doit être considéré dès la conception desdits composites, car les produits de dégradation du polymère ou les particules minérales libérées peuvent générer une réponse inflammatoire.

5.1.5 Revêtements

La surface des dispositifs médicaux implantables est la première partie qui interagit directement avec le tissu ; c'est la raison pour laquelle, au cours de ces dernières décennies, les recherches dans le domaine des biomatériaux se sont notamment concentrées sur l'amélioration des propriétés de surface des implants. L'objectif visé est non seulement de favoriser la biointégration et accélérer le processus de cicatrisation osseuse, mais également de concevoir des revêtements bioactifs capables d'interagir de manière positive avec l'environnement biologique pour favoriser la néoformation osseuse et permettre, en plus, l'association d'agents actifs (ioniques ou moléculaires) capables d'être libérés de manière contrôlée et prolongée *in situ*. L'obtention de revêtements réactifs nécessite, là encore, l'utilisation de procédés basse température qui autorisent un grand choix et une adaptabilité des phases déposées tout en limitant leur altération. Réalisés en voie humide, ils conduisent le plus souvent au dépôt de phases telles que des **apatites nanocristallines**, ou encore des phases phosphocalciques hydrolysables en apatite telles que **la brushite (DCPD)** ou le **phosphate octocalcique (OCP)**.

Toutes les techniques de **revêtement par voie humide** utilisent des solutions ou des suspensions aqueuses et/ou non aqueuses, le plus souvent dans un état métastable (solutions sursaturées et/ou suspensions de phases métastables). Le revêtement est alors réalisé par déstabilisation du système dont la sursaturation de la solution atteint localement une valeur critique qui induit la précipitation des phases phosphocalciques.

C'est Kokubo en 1990 qui fût à l'origine d'une des méthodes les plus populaires encore utilisée et déclinée aujourd'hui [187]. Cette méthode qui permet de recouvrir tous types de matériaux est basée sur l'utilisation en conditions proches des conditions physiologiques (températures de 25 °C à 37 °C et pH de la solution entre 6-8) et durant plusieurs jours voire plusieurs semaines, d'une solution sursaturée de **fluide biologique simulé SBF**, qui induit une germination hétérogène et la croissance de cristaux (apatite nanocristalline, DCPD ou OCP) à la surface des substrats traités [188] [189]. D'autres méthodes dérivées de la précédente proposent d'accélérer la précipitation et d'augmenter la quantité déposée en utilisant des solutions de SBF plus concentrées (jusqu'à 10 fois), ou

encore un barbotage de CO₂ est ajouté en vue d'acidifier la solution et de contrôler la vitesse de précipitation [190] [191]. C'est l'augmentation progressive du pH induit par le dégagement de CO₂ qui conditionne alors la précipitation. Notons néanmoins la forte instabilité du SBF, en particulier concentré [100]. Les méthodes de dépôt chimique proposent, elles, d'utiliser des conditions plus drastiques en modifiant la composition des solutions sursaturées (par adjonction de divers ions et additifs) et des températures comprises entre 0 °C et 100 °C [192] [193] [194]. Ainsi, dans le traitement par dépôt hydrothermal, le chauffage (aux alentours de 80 °C) d'une solution riche en phosphate et en complexes EDTA-Ca²⁺ engendre la libération des ions Ca²⁺ par dissociation thermique du complexe et la précipitation des phosphates de calcium généralement bien cristallisés [195] [196]. De même, un procédé basé sur les différences de solubilité à basses et hautes températures est proposé (dépôt par traitement thermique) en immergeant un substrat préalablement chauffé (jusqu'à des températures pouvant atteindre 160 °C) dans des solutions saturées appropriées. C'est alors la sursaturation locale au niveau du substrat qui induit la cristallisation (compte tenu du fait que les apatites ont une solubilité rétrograde, qui augmente par abaissement de la température) [197] [198]. Lorsque des suspensions particulières sont préférées, l'obtention d'un revêtement est basée sur une transformation à partir d'une phase liquide (sol) et d'un gel solide particulière (gel). C'est alors le drainage et l'évaporation du solvant le plus souvent organique qui engendre l'agglomération des particules déposées sur le substrat puis la densification du gel. Cette dernière technique, très courante de par sa simplicité, est effectuée par immersion (ou trempage) du substrat à vitesse constante (la vitesse de trempage et le nombre d'immersions déterminant l'épaisseur du revêtement), ou encore par centrifugation pour les supports plats (*spin coating*) [199] [200] [201]. Il est également possible de procéder à un revêtement par projection de poudre, ce qui a été récemment réalisé à « basse » température (*cold spray*) [202].

Il existe aussi des méthodes qui se limitent aux **supports métalliques conducteurs**. Ainsi les méthodes de revêtement électrochimique et électrophorétique utilisent des champs électriques appliqués sur le substrat métallique. Dans le cas des revêtements électrophorétiques, les particules en suspension migrent sous l'influence du champ électrique (électrophorèse) et sont déposées sur le substrat métallique de charge opposée [203] [204]. Le procédé électrochimique, lui, est basé sur les différentes réactions électrochimiques se produisant dans les électrolytes contenus dans la solution de traitement. Il met en œuvre des solutions riches en phosphate et calcium stables en milieu légèrement acide. Le substrat métallique est placé à la cathode et l'hydrolyse de l'eau ou la réduction de certains ions minéraux conduit à la formation d'ions hydroxyde qui provoquent une augmentation locale du pH, laquelle induit une sursaturation critique et la précipitation du dépôt, qui peut être apatitique, sur le substrat [205].

Quel que soit le procédé utilisé pour réaliser le revêtement, les propriétés physico-chimiques des revêtements dépendent des paramètres à proximité du substrat tels que le pH, la température, l'activité des ions en solution, la présence d'inhibiteur de croissance cristalline.

5.2 Nanoparticules pour la thérapie ou le diagnostic

Au-delà d'applications pour la régénération osseuse, le caractère bio-inspiré des apatites nanocristallines et l'excellente biocompatibilité qui en découle permettent d'envisager également d'autres applications biomédicales, telles qu'en

« nanomédecine » [206]. Dans ce domaine, il s'agit généralement d'interagir au niveau cellulaire soit pour une administration intracellulaire de composés actifs (anticancéreux, acides nucléiques pour la thérapie génique...), soit pour le diagnostic médical (introduction d'une sonde luminescente pour la détection de zones cancéreuses par exemple). En nanomédecine, il est par ailleurs cherché à cibler certains types cellulaires pour améliorer la spécificité du traitement ou du diagnostic, ce qui est réalisé par ajout, en surface des nanoparticules, d'un agent d'adressage cellulaire tels qu'un anticorps ou une autre molécule reconnue par des récepteurs spécifiques présents sur la membrane cellulaire (par exemple l'acide folique reconnu par des récepteurs folate surexprimés en surface de certaines cellules de cancers du sein ou de l'ovaire [207]).

Si divers types de nanoparticules ont été étudiés ces dernières décennies, un engouement se développe vers l'utilisation de composés plus bio-inspirés, tels que les apatites. En effet, comme indiqué précédemment, ces composés présentent une forte réactivité de surface permettant notamment diverses (co)adsorptions ainsi qu'une excellente biocompatibilité. Divers domaines d'application ont été visés pour les nanoparticules à base d'apatite, tels que la cancérologie [69] [206] [208] [209] [210] [211] [212], la thérapie génique [213] [214] [215], l'imagerie médicale [216] [217] [218] [219], ou encore plus récemment l'hématologie [220]. Afin de maîtriser la taille de nanoparticules d'apatites, qui présentent une forte tendance naturelle à s'agglomérer, le développement de suspensions colloïdales a notamment été réalisé, par le biais de l'adsorption de molécules organiques biocompatibles telles que le polyéthylène glycol phosphonaté, des dérivés phospholipidiques, de l'ADN [206] [212] [221]... La biocompatibilité effective des nanoparticules à base d'apatite dépend également de leurs caractéristiques propres telles que leur taille et leur chimie de surface. Des données ont été récemment obtenues sur l'hémocompatibilité de nanoparticules apatitiques stabilisées sous forme colloïdale [222].

6. Du laboratoire au patient ?

6.1 Discussion sur les aspects normatifs de l'ISO

Il n'existe pas à ce jour de norme ISO « matériaux » spécifique à l'apatite biomimétique. En effet, les normes suivantes excluent de leurs domaines d'applications (ou via la définition des constituants) l'apatite biomimétique. Il est possible d'utiliser partiellement les normes :

- ISO 13779-2:2008, ISO 13779-3:2008, ISO 13779-4:2002 ;

- ISO 13779-6:2015 sur l'hydroxyapatite ;

- la norme ISO 13175-3:2012 sur les substituts osseux à base d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique bêta.

En revanche, dans le cas de revêtements d'apatite biomimétique, il est possible d'utiliser la norme ISO 17327-1 (Implants chirurgicaux non actifs – Revêtement de l'implant – Partie 1 : Exigences générales)

Les normes relatives à l'évaluation biologique des dispositifs médicaux de la série ISO 10993 s'appliquent pleinement.

6.2 Autres considérations

Les points suivants nécessitent une attention particulière afin d'amplifier l'utilisation des apatites biomimétiques.

- La stérilisation de ces composés s'avère complexe à cause de leur forte réactivité. Pour éviter des modifications, les rayonnements gamma sont le plus souvent utilisés.

- L'intensification de la production d'apatite biomimétique est limitée par la faible concentration des ions présents. Une adaptabilité de ces concentrations est cependant possible.

- L'appropriation par les cliniciens et industriels requiert encore une diffusion accrue d'informations relatives aux différences fondamentales existant entre l'hydroxyapatite stœchiométrique « haute température » et l'apatite biomimétique, mises en exergue dans le présent article notamment, ainsi qu'une identification claire dans les dispositifs médicaux.

7. Conclusion

Les apatites nanocristallines sont naturellement présentes dans certaines biominéralisations (minéral osseux, dentine...) et des analogues biomimétiques de synthèse peuvent être préparés par chimie douce. Ces composés, qu'ils soient d'origine naturelle ou de synthèse, présentent de nombreuses différences (composition chimique, structure...) avec l'hydroxyapatite stœchiométrique. Il convient d'avoir en mémoire ces particularités car celles-ci sont en lien direct avec la forte réactivité/bioactivité des apatites nanocristallines, mais aussi avec leur métastabilité. Ces composés peuvent être utilisés pour des applications telles que la régénération osseuse ou encore la nanomédecine, en exploitant en particulier leur biocompatibilité « intrinsèque ». Loin de n'être que des « curiosités de laboratoire », les apatites biomimétiques sont à la base de divers biomatériaux bioactifs sous différentes formes (revêtements, matrices denses ou poreuses, ciments injectables, (nano)particules...).

Bien que les recherches en cours dans ce domaine soient de plus en plus nombreuses et que quelques produits utilisant des apatites biomimétiques aient atteint le marché des dispositifs médicaux, il reste cependant encore du chemin à parcourir pour développer l'utilisation de ces composés en clinique. Dans tous les cas, une attention toute particulière doit être prêtée à la caractérisation de ces matériaux ainsi qu'à toute étape du procédé de fabrication pouvant modifier les nanocristaux d'apatite biomimétique.

8. Glossaire

Biomimétique ; biomimetic

fait référence au biomimétisme, c'est-à-dire à la notion d'imitation de concepts développés dans la Nature. Attention, plusieurs aspects relèvent du biomimétisme, l'on peut par exemple envisager de mimer une fonction de l'organisme, ou encore la composition chimique d'un tissu biologique, etc. Le paragraphe 3 reprend la notion de biomimétisme en lien avec les apatites en en déclinant plusieurs degrés.

Calcification ectopique ; ectopic calcification

se dit d'une calcification anormale (pathologique), et correspond à un phénomène de minéralisation dans des tissus autres que le tissu osseux ou dentaire (exemple : calcification de tendons, de parois artérielles...).

Domaine (ou mode) de vibration (vibration mode)

fait référence aux caractéristiques vibrationnelles des liaisons chimiques présentes dans un composé. Dans le cas de l'ion phosphate PO_4^{3-} par exemple, quatre modes peuvent être identifiés. Ceux-ci sont généralement notés par la lettre grecque « nu » (ν). Certaines modes peuvent être relatifs à un

mouvement d'élongation de liaison, d'autres à un mouvement de déformation angulaire. Pour plus d'information sur les modes de vibration attendus pour les phosphates de calcium, se référer par exemple à la référence [224].

Échange ionique ; ion exchange

fait référence ici au fait que les apatites nanocristallines biomimétiques peuvent, dans certaines conditions, échanger de manière dynamique une partie de leurs ions de surface (contenus dans la couche hydratée non apatitique présente en surface des nanocristaux) avec des ions présents dans la solution environnante. Attention, ce concept ne doit pas être confondu avec le phénomène de substitution ionique au cœur des nanocristaux qui indique que sites cristallographiques du cœur apatitique peuvent être occupés par différents types d'ions (par exemple une partie des ions PO_4^{3-} peut être occupée par des ions CO_3^{2-} ou SiO_4^{4-}).

Frittage flash ; Spark Plasma Sintering SPS

fait référence à un procédé de frittage/consolidation rapide de matériaux, faisant appel à un mode de chauffage non conventionnel utilisant le passage d'un courant électrique à travers un moule conducteur (et au travers du matériau si celui-ci est conducteur). Cette approche permet de mettre en œuvre des vitesses de montée et descente en température très élevées (plusieurs centaines de degrés Celsius par minute, par exemple), limitant alors l'évolution et l'altération du matériau et pouvant parfois permettre la consolidation de composés métastables.

Ion labile ; labile ion

fait référence au fait que les ions présents dans la couche hydratée en surface des nanocristaux d'apatite peuvent être échangés par des ions de la solution (souvent de manière réversible, bien que dépendant de l'état de maturation de l'apatite). Ces ions sont donc relativement « mobiles » ou « labiles » et peuvent prendre part plus aisément à des réactions de surface.

Nanomédecine ; nanomedicine

concerne les applications biomédicales des nanotechnologies. Cela fait référence à l'utilisation de systèmes nanométriques (nanoparticules par exemple) pour une action typiquement à l'échelle cellulaire, que ce soit pour du diagnostic ou de la thérapie.

Fluide biologique simulé ; Simulated Body Fluid SBF

représente une solution dont la composition chimique s'approche de celle de fluides biologiques, typiquement ici du plasma sanguin. Attention, une telle solution ne contient que les éléments minéraux du plasma, et donc pas les biomolécules (protéines...) présentes dans le plasma réel ; de plus, les cellules en sont bien entendu absentes, ce qui rend difficile une transposition directe avec des tests réalisés en conditions *in vitro* ou *in vivo*.

Thermo-décomplexation ; thermo-decomplexing

fait référence ici à un chélate ionique se décomplexant progressivement lorsque la température augmente, libérant ainsi ses ions constitutifs devenant disponibles pour des réactions en solution.

Trocart ; trocar

tige métallique cylindrique acérée coulissant à l'intérieur d'une canule.

Apatites biomimétiques

Des biominéraux aux analogues de synthèse pour le biomédical

par **Christophe DROUET**

Docteur en sciences des matériaux
Directeur de Recherche CNRS, Laboratoire CIRIMAT (Toulouse)

David GROSSIN

Docteur en chimie des matériaux
Maître de Conférences à l'Institut National Polytechnique de Toulouse,
Laboratoire CIRIMAT (Toulouse)

Christèle COMBES

Docteur en science des matériaux
Professeur à l'Institut National Polytechnique de Toulouse,
Laboratoire CIRIMAT (Toulouse)

Stéphanie SARDA

Docteur en sciences des matériaux
Maître de Conférences à l'Université Toulouse III Paul Sabatier,
Laboratoire CIRIMAT (Toulouse)

Sophie CAZALBOU

Docteur en sciences et génie des matériaux
Maître de Conférences à l'Université Toulouse III Paul Sabatier,
Laboratoire CIRIMAT (Toulouse)

et **Christian REY**

Docteur en sciences physiques
Professeur Emérite, Institut National Polytechnique de Toulouse,
Laboratoire CIRIMAT (Toulouse)

Sources bibliographiques

- [1] LOWENSTAM (H.A.). – *Minerals formed by organisms*. Science 211 1126-1131 (1981).
- [2] ENSIKAT (H.J.r.), GEISLER (T.) et WEIGEND (M.). – *A first report of hydroxylated apatite as structural biomineral in Loasaceae-plants' teeth against herbivores*. Scientific Reports 6 1-10 (2016).
- [3] KIRSCH (T.). – *Biom mineralization : An active or passive process ?*. Connective Tissue Research 53(6) 438-445 (2012).
- [4] WHITE (T.J.) et ZHILI (D.). – *Structural derivation and crystal chemistry of apatites*. Acta Crystallographica Section B: Structural Science B59 1-16 (2003).
- [5] COMBES (C.), CAZALBOU (S.) et REY (C.). – *Apatite Biominerals*. Minerals 6(34) 1-25 (2016).
- [6] MONTEL (G.), BONEL (G.), HEUGHEBAERT (J.C.), TROMBE (J.C.) et REY (C.). – *New concepts in the composition, crystallization and growth of the mineral components of calcified tissues*. J. Cryst. Growth 53 74-79 (1981).
- [7] LEGROS (R.), BALMAIN (N.) et BONEL (G.). – *Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone*. Calcified Tissue International 41(3) 137-144 (1987).
- [8] REY (C.) et COMBES (C.). – *Physical chemistry of biological apatites*, in : C. Aparicio, M. Pau Ginebra (Eds.). Woodhead publishing, Swanston, Cambridge, UK, pp. 95-128 (2015).
- [9] NEUMAN (W.F.), TORIBARA (T.Y.) et MULRYAN (B.J.). – *The surface chemistry of bone. VII. The hydration shell*. J. Am. Chem. Soc. 75(17) 4239-4242 (1953).
- [10] PELLEGRINO (E.D.) et BILTZ (R.M.). – *Mineralization in the chick embryo. I. Monohydrogen phosphate and carbonate relationships during maturation of the bone crystal complex*. Calcif. Tissue Res. 10(2) 128-35 (1972).
- [11] REY (C.), LIAN (J.), GRYNPAS (M.), SHAPIRO (F.), ZYLBERBERG (L.) et GLIMCHER (M.J.). – *Non-apatitic environments in bone mineral : FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states*. Connective tissue research 21(1-4) 267-73 (1989).
- [12] REY (C.), RENUGOPALAKRISHNAN (V.), SHIMIZU (M.), COLLINS (B.) et GLIMCHER (M.J.). – *A resolution-enhanced Fourier Transform Infrared spectroscopic study of the environment of the CO₃²⁻ ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation*. Calcified Tissue International 49 259-268 (1991).
- [13] REY (C.), RENUGOPALAKRISHNAN (V.), COLLINS (B.) et GLIMCHER (M.J.). – *Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging*. Calcif. Tissue Int. 49 251-258 (1991).
- [14] WU (Y.), GLIMCHER (M.), REY (C.) et ACKERMAN (J.). – *A Unique Protonated Phosphate Group in Bone-Mineral Not Present in Synthetic Calcium Phosphates – Identification by P-31 Solid-State Nmr-Spectroscopy*. Journal of Molecular Biology 244(4) 423-435 (1994).
- [15] CRANE (N.J.), POPESCU (V.), MORRIS (M.D.), STEENHUIS (P.) et IGNEZLI (M.A.). – *Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization*. Bone 39 434-442 (2006).
- [16] WANG (Y.), VON EUW (S.), LAURENT (G.), CREVANT (C.), BONHOMME-COURY (L.), GIRAUD-GUILLE (M.-M.), BABONNEAU (F.), NASSIF (N.) et AZAIS (T.). – *Impact of collagen confinement vs. ionic substitutions on*

- the local disorder in bone and biomimetic apatites. *Materials Horizons* 1 224-231 (2014).
- [17] DROUET (C.). – *Apatite formation : why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds*. BioMed research international 1-12, article 490946 (2013).
- [18] IYENGAR (G.V.) et TANDON (L.). – *Minor and Trace Elements in Human Bones and Teeth*(NAHRES-39). International Atomic Energy Agency (IAEA), 31 1-100 (1999).
- [19] HENDRICKS (S.) et HILL (W.). – *The Nature of Bone and Phosphate Rock*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 36(12) 731-737 (1950).
- [20] LAKOMAA (E.L.) et RYTÖMAA (I.). – *Mineral composition of enamel and dentin of primary and permanent teeth in Finland*. Scandinavian journal of dental research 85(2) 89-95 (1977).
- [21] DRIESSENS (F.C.M.) et VERBEECK (R.M.H.). – *Biomaterials*. CRC Press, Boca Raton (1990).
- [22] ISHIGURO (K.), NAKAGAKI (H.), TAKEUCHI (K.), MUKAI (M.), YOSHIKA (I.), MIYAUCHI (K.), ROBINSON (C.) et WEATHERELL (J.A.). – *Distribution of fluoride in the dental tissues and their supporting mandibular bone from the same individual*. Archives of Oral Biology 39(6) 535-537 (1994).
- [23] SOARES (M.a.B.), ADACHI (E.M.) et SAIKI (M.). – *INAA of enamel and dentine samples of a group of children and adults : A comparative study*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 276(1) 49-52 (2007).
- [24] ZENÓBIO (M.a.F.), TAVARES (M.S.N.), ZENÓBIO (E.G.) et SILVA (T.A.). – *Elemental composition of dental biologic tissues : study by means of different analytical techniques*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 289(1) 161-166 (2011).
- [25] SAIKI (M.), ADACHI (L.K.) et ADACHI (E.M.). – *Elemental comparison in sound and carious human teeth by instrumental neutron activation analysis*. European Radiology 24(1) 29-32 (2014).
- [26] DE DIOS TERUEL (J.), ALCOLEA (A.), HERNÁNDEZ (A.) et RUIZ (A.J.O.). – *Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth*. Archives of Oral Biology 60(5) 768-775 (2015).
- [27] REY (C.), SHIMIZU (M.), COLLINS (B.) et GLIMCHER (M.J.). – *Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age : 2. Investigations in the n3 PO4 Domain*. Calcif. Tissue Int. 49 383-388 (1991).
- [28] BOIVIN (G.) et MEUNIER (P.J.). – *The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography*. Calcified tissue international 70(6) 503-11 (2002).
- [29] BALA (Y.), FARLAY (D.), DELMAS (P.D.), MEUNIER (P.J.) et BOIVIN (G.). – *Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes*. Bone 46(4) 1204-12 (2010).
- [30] ROLLIN-MARTINET (S.), NAVROTSKY (A.), CHAMPION (E.), GROSSIN (D.) et DROUET (C.). – *Thermodynamic basis for evolution of apatite in calcified tissues*. The American Mineralogist 98 2037-2045 (2013).
- [31] WU (V.M.) et USKOKOVIC (V.). – *Is there a relationship between solubility and resorbability of different calcium phosphate phases in vitro ?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects 1860(10) 2157-2168 (2016).
- [32] LEGEROS (R.Z.), LEGEROS (J.P.), DACULSI (G.) et KIJKOWSKA (R.). – *Calcium phosphate biomaterials : preparation, properties, and biodegradation*, in : D.L. Wise, D.J. Tarranto, D.E. Altobelli, M.J. Yaszemski, Gresser, J.D., E.R. Schwartz (Eds.). Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Marcel Dekker, New York, pp. 1429-1463 (1995).
- [33] VANDECANDELAERE (N.), REY (C.) et DROUET (C.). – *Biomimetic apatite-based biomaterials : on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine 23(11) 2593-2606 (2012).
- [34] DROUET (C.), AUFRAY (M.), ROLLIN-MARTINET (S.), VANDECANDELAÈRE (N.), GROSSIN (D.), ROSSIGNOL (F.), CHAMPION (E.), NAVROTSKY (A.) et REY (C.). – *Nanocrystalline apatites : the fundamental role of water*. American Mineralogist in press – accessible online (2018).
- [35] EICHERT (D.), DROUET (C.), SFIHI (H.), REY (C.) et COMBES (C.). – *Nanocrystalline apatite-based biomaterials : synthesis, processing and characterization*, in : J.B. Kendall (Ed.). Biomaterials Research Advances, Nova Science Publishers, pp. 93-143 (2007).
- [36] REY (C.), COMBES (C.), DROUET (C.), SFIHI (H.) et BARROUG (A.). – *Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites : Implications for biominerals and biomaterials*. Materials Science and engineering C 27(2) 198-205 (2007).
- [37] REY (C.), SHIMIZU (M.), COLLINS (B.) et GLIMCHER (M.J.). – *Resolution-enhanced Fourier-Transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel, and their evolution with age.1. Investigations in the v4 PO4 domain*. Calcified Tissue International 46(6) 384-394 (1990).
- [38] WANG (Y.), VON EUW (S.), FERNANDES (F.M.), CASSAIGNON (S.), SELMANE (M.), LAURENT (G.), PEHAU-ARNAUDET (G.), COELHO (C.), BONHOMME-COURY (L.), GI-RAUD-GUILLE (M.-M.), BABONNEAU (F.), AZAIS (T.) et NASSIF (N.). – *Water-mediated structuring of bone apatite*. Nat Mater 12(12) 1144-1153 (2013).
- [39] JAGER (C.), WELZEL (T.), MEYER-ZAIKA (W.) et EPPEL (M.). – *A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite*. Magnetic Resonance in Chemistry 44(6) (2006).
- [40] BERTINETTI (L.), TAMPIERI (A.), LANDI (E.), DUCATI (C.), MIDGLEY (P.A.), COLUCCIA (S.) et MARTRA (G.). – *Surface Structure, Hydration, and Cationic Sites of Nanohydroxyapatite : UHR-TEM, IR, and Microgravimetric Studies*. The Journal of Physical Chemistry C 111(10) 4027-4035 (2007).
- [41] FOWLER (B.O.), MARKOVIC (M.) et BROWN (W.E.). – *Octacalcium phosphate. 3. Infrared and Raman vibrational spectra*. Chemistry of Materials 5(10) 1417-1423 (1993).
- [42] PASCHALIS (E.P.), MENDELSON (R.) et BOSKEY (A.L.). – *Infrared assessment of bone quality : a review*. Clin Orthop Relat Res 469(8) 2170-8 (2011).
- [43] BELOUSOVA (E.A.), GRIFFIN (W.L.), O'REILLY (S.Y.) et FISHER (N.I.). – *Apatite as an indicator mineral for mineral exploration : trace-element compositions and their relationship to host rock type*. Journal of Geochemical Exploration 76(1) 45-69 (2002).
- [44] DROUET (C.). – *A comprehensive guide to experimental and predicted thermodynamic properties of phosphate apatite minerals in view of applicative purposes*. The Journal of Chemical Thermodynamics 81(0) 143-159 (2015).
- [45] MAHBOOBEH (H.S.), DROUET (C.), AL-KATTAN (A.) et NAVROTSKY (A.). – *Energetics of lanthanide-doped calcium phosphate apatite*. The American Mineralogist 99 2320-2327 (2014).
- [46] BEN CHERIFA (A.) et JEMAL (M.). – *Enthalpy of formation and mixing of calcium-cadmium chlorapatites*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 68(3) 1035-1044 (2002).
- [47] BEN ABDELKADER (S.), KHATTECH (I.), REY (C.) et JEMAL (M.). – *Synthesis, characterization and thermochemistry of calcium-magnesium hydroxyapatite and fluorapatite*. Thermochimica Acta 376(1) 25-36 (2001).
- [48] NTAHOMVUKIYE (I.), KHATTECH (I.) et JEMAL (M.). – *Synthesis and thermochemistry of calcium-lead fluorapatites*. Annales De Chimie-Science Des Matériaux 22(7) 435-446 (1997).
- [49] DROUET (C.) et ALPHONSE (P.). – *ThermAP additive model for applied predictive thermodynamics, Therm'AP free calculation program*, www.christophedrouet.com/thermAP.html. Toulouse, France (2015).
- [50] CAZALBOU (S.), HINA (A.) et REY (C.). – *Interactions between trace elements and bone mineral matrix*, in : M. Abdulla, M. Bost, S. Gamon, P. Arnaud, G. Chazot (Eds.). New aspects of trace element research, Smith-Gordon, pp. 58-62 (1999).
- [51] CAZALBOU (S.), EICHERT (D.), RANZ (X.), DROUET (C.), COMBES (C.), HARMAND (M.F.) et REY (C.). – *Ion exchanges in apatites for biomedical application*. J. Mater. Sci. – Mater. Med. 16(5) 405-409 (2005).
- [52] CAZALBOU (S.), COMBES (C.), EICHERT (D.), REY (C.) et GLIMCHER (M.J.). – *Poorly crystalline apatites : evolution and maturation in vitro and in vivo*. Journal of Bone and Mineral Metabolism 22(4) 310-317 (2004).
- [53] CAZALBOU (S.). – *Échanges cationiques impliquant des apatites nanocrystallines analogues au minéral osseux*. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse (2000).
- [54] REY (C.), COMBES (C.), DROUET (C.), CAZALBOU (S.), GROSSIN (D.), BROUILLET (F.) et SARDA (S.). – *Surface properties of biomimetic nanocrystalline apatites ; applications in biomaterials*. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials 60(3-4) 63-73 (2014).
- [55] DROUET (C.), CARAYON (M.-T.), COMBES (C.) et REY (C.). – *Surface enrichment of biomimetic apatites with biologically-active ions Mg²⁺ and Sr²⁺ : A preamble to the activation of bone repair materials*. Materials Science and Engineering C 28(8) 1544-1550 (2008).
- [56] CAZALBOU (S.), EICHERT (D.), DROUET (C.), COMBES (C.) et REY (C.). – *Biological mineralisations based on calcium phosphate*. Comptes Rendus Palevol 3(6-7) 563-572 (2004).
- [57] DIALLO GARCIA (S.). – *Hydroxyapatites, an atypical basic system tuneable by synthesis :*

toward the identification of active sites. Thèse Université Pierre et Marie Curie – Paris VI (2012).

- [58] GOLDBERG (H.A.), WARNER (K.J.) et HUNTER (G.K.). – *Binding of bone sialo-protein osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite*. *Connect. Tissue Res.* 42 25-37 (2001).
- [59] HAUSCHKA (P.V.), LIAN (J.B.), COLE (D.E.) et GUNDBERG (C.M.). – *Osteocalcin and matrix Gla protein : vitamin K-dependent proteins in bone*. *Physiological Reviews* 69(3) 990-1047 (1989).
- [60] DAVIES (J.). – *In vitro modeling of the bone/implant interface*. *The Anatomical Record* 245(2) 426-445 (1996).
- [61] ERRASSIFI (F.), MENBAOUI (A.), AUTEFAGE (H.), BENAZIZ (L.), OUIZAT (S.), SANTRAN (V.), SARDA (S.), LEBUGLE (A.), COMBES (C.), BARROUG (A.), SFIHI (H.) et REY (C.). – *Adsorption on apatitic calcium phosphates : applications to drug delivery*, in : R. Narayan, J. McKittrick (Eds.). *Advances in Bioceramics and Biotechnologies*, Amer Ceramic Soc, Westerville, pp. 159-174 (2010).
- [62] NANCOLLAS (G.H.), TANG (R.), PHIPPS (R.J.), HENNEMAN (Z.), GULDE (S.), WU (W.), MANGOOD (A.), RUSSELL (R.G.) et EBETINO (F.H.). – *Novel insights into actions of bisphosphonates on bone : differences in interactions with hydroxyapatite*. *Bone*. 38(5) 617-27 (2006).
- [63] COMBES (C.) et REY (C.). – *Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity*. *Biomaterials* 23(13) 2817-2823 (2002).
- [64] OUIZAT (S.), BARROUG (A.), LEGROURI (A.) et REY (C.). – *Adsorption of bovine serum albumin on poorly crystalline apatite : influence of maturation*. *Materials Research Bulletin* 34(14-15) 2279-2289 (1999).
- [65] AUTEFAGE (H.), BRIAND-MÉSANGE (F.), CAZALBOU (S.), DROUET (C.), FOURMY (D.), GONÇALVES (S.), SALLES (J.-P.), COMBES (C.), SWIDER (P.) et REY (C.). – *Adsorption and release of BMP-2 on nanocrystalline apatite-coated and uncoated hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate porous ceramics*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B : Applied Biomaterials* 91B(2) 706-715 (2009).
- [66] BENAZIZ (L.), BARROUG (A.), LEGROURI (A.), REY (C.) et LEBUGLE (A.). – *Adsorption of O-Phospho-L-Serine and L-Serine onto Poorly Crystalline Apatite*. *Journal of Colloid and Interface Science* 238(1) 48-53 (2001).
- [67] PASCAUD (P.), ERRASSIFI (F.), BROUILLET (F.), SARDA (S.), BARROUG (A.), LEGROURI (A.) et REY (C.). – *Adsorption on apatitic calcium phosphates for drug delivery : interaction with bisphosphonate molecules*. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine* 25(10) 2373-2381 (2014).
- [68] BARROUG (A.), LEGROURI (A.) et REY (C.). – *Exchange reactions at calcium phosphates surface and applications to biomaterials*. *Key Engineering Materials* 361-363 79-82 (2008).
- [69] IAFISCO (M.), DROUET (C.), ADAMIANO (A.), PASCAUD (P.), MONTESEI (M.), PANSEI (S.), SARDA (S.) et TAMPRIERI (A.). – *Superparamagnetic iron-doped nanocrystalline apatite as a delivery system for doxorubicin*. *Journal of Materials Chemistry B* 4(1) 57-70 (2016).
- [70] CAZALBOU (S.), BERTRAND (G.) et DROUET (C.). – *Tetracycline-Loaded Biomimetic Apatite : An Adsorption Study*. *The Journal of Physical Chemistry B* (2015).
- [71] HAMMAMI (K.), EL-FEKI (H.), MARSAN (O.) et DROUET (C.). – *Adsorption of nucleotides on biomimetic apatite : The case of adenosine 5' triphosphate (ATP)*. *Applied Surface Science* 360 979-988 (2016).
- [72] CHOIMET (M.), TOURRETTE (A.) et DROUET (C.). – *Adsorption of nucleotides on biomimetic apatite : The case of cytidine 5' monophosphate (CMP)*. *Journal of Colloid and Interface Science* 456 132-137 (2015).
- [73] HAMMAMI (K.), EL FEKI (H.), MARSAN (O.) et DROUET (C.). – *Adsorption of nucleotides on biomimetic apatite : The case of adenosine 5' monophosphate (AMP)*. *Applied Surface Science* 353 165-172 (2015).
- [74] GRUNENWALD (A.), KEYSER (C.), SAUTEREAU (A.M.), CRUBEZY (E.), LUDES (B.) et DROUET (C.). – *Adsorption of DNA on biomimetic apatites : Toward the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA*. *Applied Surface Science* 292 867-875 (2014).
- [75] PASCAUD (P.), GRAS (P.), COPPEL (Y.), REY (C.) et SARDA (S.). – *Interaction between a bisphosphonate, tiludronate, and biomimetic nanocrystalline apatites*. *Langmuir* 29 2224-2232 (2013).
- [76] IAFISCO (M.), SABATINO (P.), LESCI (I.G.), PRAT (M.), RIMONDINI (L.) et ROVERI (N.). – *Conformational modifications of serum albumins adsorbed on different kinds of biomimetic hydroxyapatite nanocrystals*. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 81(1) 274-284 (2010).
- [77] ERRASSIFI (F.), SARDA (S.), BARROUG (A.), LEBUGLE (A.), LEGROURI (A.), SFIHI (H.) et REY (C.). – *Adsorption of a bisphosphonate onto apatitic calcium phosphates : role of surface characteristics*, in : *Recherphos (Ed.) Covaphos III*, Marrocco, Marrakech, pp. 153-159 (2009).
- [78] REY (C.), COMBES (C.), DROUET (C.), SFIHI (H.) et BARROUG (A.). – *Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites : Implications for biominerals and biomaterials*. *Materials Science and Engineering : C* 27(2) 198-205 (2007).
- [79] BARROUG (A.), KUHN (L.T.), GERSTENFELD (L.C.) et GLIMCHER (M.J.). – *Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles : in vitro controlled adsorption and release*. *J. Orthop. Res.* 22(4) 703-708 (2004).
- [80] YIN (G.), LIU (Z.), ZHAN (J.), DING (F.) et YUAN (N.). – *Impacts of the surface charge property on protein adsorption on hydroxyapatite*. *Chemical Engineering Journal* 87(2) 181-186 (2002).
- [81] BARROUG (A.), LERNOUX (E.), LEMAITRE (J.) et ROUXHET (P.G.). – *Adsorption of Catalase on Hydroxyapatite*. *Journal of Colloid and Interface Science* 208(1) 147-152 (1998).
- [82] MIDY (V.), HOLLANDE (E.), REY (C.), DARD (M.) et PLOUËT (J.). – *Adsorption of vascular endothelial growth factor to two different apatitic materials and its release*. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine* 12(4) 293-298 (2001).
- [83] PALAZZO (B.), IAFISCO (M.), LAFORGIA (M.), MARGIOTTA (N.), NATILE (G.), BIANCHI (C.L.), WALSH (D.), MANN (S.) et ROVERI (N.). – *Biomimetic Hydroxyapatite-Drug Nanocrystals as Potential Bone Substitutes with Antitumor Drug Delivery Properties*. *Adv Func Mater.* 17(13) 2180-2188 (2007).
- [84] IAFISCO (M.), PALAZZO (B.), MARCHETTI (M.), MARGIOTTA (N.), OSTUNI (R.), NATILE (G.), MORPURGO (M.), GANDIN (V.), MARZANO (C.) et ROVERI (N.). – *Smart delivery of antitumoral platinum complexes from biomimetic hydroxyapatite nanocrystals*. *Journal of Materials Chemistry* 19(44) 8385-8392 (2009).
- [85] GROSSIN (D.), ROLLIN-MARTINET (S.), ESTOURNES (C.), ROSSIGNOL (F.), CHAMPION (E.), COMBES (C.), REY (C.), CHEVALLIER (G.) et DROUET (C.). – *Biomimetic apatite sintered at very low temperature by spark plasma sintering : Physico-chemistry and microstructure aspects*. *Acta Biomaterialia* 6(2) 577-585 (2010).
- [86] ELLIOTT (J.C.). – *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. Elsevier Science, Amsterdam (1994).
- [87] YOUNG (R.A.) et HOLCOMB (D.W.). – *Variability of hydroxyapatite preparations*. *Calcif Tissue Int* 34 Suppl 2 S17-32 (1982).
- [88] DROUET (C.), BOSCH (F.), BANU (M.), LARGÉOT (C.), COMBES (C.), DECHAMBRE (G.), ESTOURNÈS (C.), RAIMBEAUX (G.) et REY (C.). – *Nanocrystalline apatites : From powders to biomaterials*. *Powder Technology* 190(1-2) 118-122 (2009).
- [89] CAZALBOU (S.), COMBES (C.), EICHERT (D.) et REY (C.). – *Adaptive physico-chemistry of bio-related calcium phosphates*. *Journal of Materials Chemistry* 14(14) 2148-2153 (2004).
- [90] REY (C.), COLLINS (B.), GOEHL (T.), DICKSON (I.R.) et GLIMCHER (M.J.). – *The carbonate environment in bone-mineral – A resolution enhanced Fourier-Transform Infrared Spectroscopy study*. *Calcified Tissue International* 45(3) 157-164 (1989).
- [91] REY (C.), HINA (A.), TOFIGHI (A.) et GLIMCHER (M.J.). – *Maturation of poorly crystalline apatites : Chemical and structural aspects in vivo and in vitro*. *Cells and Materials* 5(4) 345-356 (1995).
- [92] SAKHNO (Y.), BERTINETTI (L.), IAFISCO (M.), TAMPRIERI (A.), ROVERI (N.) et MARTRA (G.). – *Surface Hydration and Cationic Sites of Nanohydroxyapatites with Amorphous or Crystalline Surfaces : A Comparative Study*. *Journal of Physical Chemistry C* 114(39) 16640-16648 (2010).
- [93] EICHERT (D.), DROUET (C.), SFIHI (H.), REY (C.) et COMBES (C.). – *Book Chapter : Nanocrystalline apatite based biomaterials : synthesis, processing and characterization*. *Book : Biomaterials Research Advances*, Nova Publisher, pp. 93-143 (2008).
- [94] ZAHIDI (E.), LEBUGLE (A.) et BONEL (G.). – *Sur une nouvelle classe de matériaux pour prothèses osseuses ou dentaires*. *Bull Soc Chim Fr* 4 523-537 (1985).
- [95] RODRIGUES (A.) et LEBUGLE (A.). – *Influence of ethanol in the precipitation medium on the composition, structure and reactivity of tricalcium phosphate*. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 145(1) 191-204 (1998).
- [96] DABBARH (F.), LEBUGLE (A.), TAITAI (A.) et BENNANI (M.). – *Influence du séchage sur la composition de phosphates de calcium carbonatés, analogues osseux*. *Annales de Chimie Science des Matériaux* 25(5) 339-348 (2000).
- [97] LEBUGLE (A.), ZAHIDI (E.) et BONEL (G.). – *Effect of structure and composition on the thermal decomposition of calcium phosphates (Ca/P = 1.33)*. *Reactivity of Solids* 2(1) 151-161 (1986).

- [98] VANDECANDELAERE (N.). – *Élaboration et caractérisation de biomatériaux osseux innovants à base d'apatites phospho-calciques dopées.* (2012).
- [99] LEGEROS (R.Z.). – *Biological and synthetic apatites.* CRC Press, Boca Raton (1994).
- [100] TAS (A.C.) et BHADURI (S.B.). – *Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10x simulated body fluid.* Journal of Materials Research 19(9) 2742-2749 (2004).
- [101] DELGADO-LOPEZ (J.M.), IAFISCO (M.), RODRIGUEZ (I.), TAMPRIERI (A.), PRAT (M.) et GOMEZ-MORALES (J.). – *Crystallization of bioinspired citrate-functionalized nanoapatite with tailored carbonate content.* Acta Biomaterialia 8(9) 3491-3499 (2012).
- [102] GÓMEZ-MORALES (J.), IAFISCO (M.), DELGADO-LOPEZ (J.M.), SARDA (S.) et DROUET (C.). – *Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization : Overview of fundamental and applied aspects.* Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials 59(1) 1-46 (2013).
- [103] FATTIBENE (P.) et CALLENS (F.). – *EPR dosimetry with tooth enamel : A review.* Applied Radiation and Isotopes 68(11) 2033-2116 (2010).
- [104] AMRAH-BOUALI (S.), REY (C.), LEBUGLE (A.) et BERNACHE (D.). – *Surface modifications of hydroxyapatite ceramics in aqueous media.* Biomaterials 15 269-272 (1994).
- [105] LU (H.B.), CAMPBELL (C.T.), GRAHAM (D.J.) et RATNER (B.D.). – *Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and TOF-SIMS.* Analytical Chemistry 72(13) 2886-2894 (2000).
- [106] LOONG (C.K.), REY (C.), KUHN (L.T.), COMBES (C.), WU (Y.), CHEN (S.H.) et GLIMCHER (M.J.). – *Evidence of hydroxyl-ion deficiency in bone apatites : An inelastic neutron-scattering study.* Bone 26 599-602 (2000).
- [107] JALLOT (E.) et MORETTO (P.). – *Characterization, by the PIXE method, of trace elements during physicochemical reactions at the periphery of bioactive glass pastilles in contact with biological fluids.* Instrumentation Science and Technology 34(4) 405-416 (2006).
- [108] BRES (E.F.), REYES-GASGA (J.), REY (C.) et MICHEL (J.). – *Probe size study of apatite irradiation in stem.* European Physical Journal-Applied Physics 67 (2014).
- [109] LEGEROS (R.), TRAUTZ (O.R.), LEGEROS (J.P.) et KLEIN (E.). – *Carbonate substitution in the apatite structure.* Bull. Soc. Chim. Fr. 1712-1718 (1968).
- [110] BADDIEL (C.B.) et BERRY (E.E.). – *Spectrostructure Correlations in hydroxy and fluorapatite.* Spectrochimica Acta 22 1407-8 (1966).
- [111] ARENDS (J.) et DAVIDSON (C.L.). – *HPO₄²⁻ content in enamel and artificial carious lesions.* Calcif. Tissue Res. 18 65-79 (1975).
- [112] REY (C.), SHIMIZU (M.), COLLINS (B.) et GLIMCHER (M.J.). – *Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I : Investigations in the n4 PO₄ domain.* Calcif. Tissue Int. 46 384-394 (1990).
- [113] REY (C.), COLLINS (B.), GOEHL (T.) et GLIMCHER (M.J.). – *The carbonate environment in bone mineral. A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study.* Calcif. Tissue Int. 45 157-164 (1989).
- [114] MILLER (L.M.), VAIRAVAMURTHY (V.), CHANCE (M.R.), MENDELSON (R.), PASCHALIS (E.P.), BETTS (F.) et BOSKEY (A.L.). – *In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν(4) PO₄³⁻ vibration.* Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects 1527 11-19 (2001).
- [115] BOSKEY (A.L.) et MENDELSON (R.). – *Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues.* Vib Spectrosc 38 107-114 (2005).
- [116] COMBES (C.), REY (C.) et MOUNIC (S.). – *Identification and evaluation of HPO₄ ions in biomimetic poorly crystalline apatite and bone mineral, in : S. Giannini, A. Moroni (Eds.), pp. 143-146 (2000).*
- [117] EICHERT (D.), SFIHI (H.), COMBES (C.) et REY (C.). – *Specific Characteristics of Wet Nanocrystalline Apatites. Consequences on Biomaterials and Bone Tissue.* Key Engineering Materials 254-256 927-930 (2004).
- [118] DEMNATI (I.), GROSSIN (D.), COMBES (C.) et REY (C.). – *Plasma-Sprayed Apatite Coatings : Review of Physical-Chemical Characteristics and Their Biological Consequences.* Journal of Medical and Biological Engineering 34(1) 1-7 (2014).
- [119] ROUFOSSE (A.H.), AUE (W.P.), ROBERTS (J.E.), GLIMCHER (M.J.) et GRIFFIN (R.G.). – *Investigation of the mineral phases of bone by solid-state phosphorus-31 magic angle sample spinning nuclear magnetic resonance.* Biochemistry 23(23) 6115-6120 (1984).
- [120] ARENDS (J.), CHRISTOFFERSEN (J.), CHRISTOFFERSEN (M.R.), ECKERT (H.), FOWLER (B.O.), HEUGHEBAERT (J.C.), NANCOLLAS (G.H.), YESINOWSKI (J.P.) et ZAWACKI (S.J.). – *A calcium hydroxyapatite precipitated from an aqueous solution. An international multimethod analysis.* Journal of Crystal Growth 84(3) 515-532 (1987).
- [121] BESHAK (K.), REY (C.), GLIMCHER (M.J.), SCHIMIZU (M.) et GRIFFIN (R.G.). – *Solid state C-13 and proton NMR studies of carbonate-containing calcium phosphates and enamel.* Journal of Solid State Chemistry 84(1) 71-81 (1990).
- [122] YESINOWSKI (J.P.). – *Nuclear magnetic resonance spectroscopy of calcium phosphates, in : Z. Amjad (Ed.). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 1998, pp. 103-143.*
- [123] LAURENCIN (D.), WONG (A.), CHRZANOWSKI (W.), KNOWLES (J.C.), QIU (D.), PICKUP (D.M.), NEWPORT (R.J.), GAN (Z.), DUER (M.J.) et SMITH (M.E.). – *Probing the calcium and sodium local environment in bones and teeth using multinuclear solid state NMR and X-ray absorption spectroscopy.* Physical Chemistry Chemical Physics 12(5) (2010).
- [124] YI (H.), BALAN (E.), GERVAIS (C.), SEGALIN (L.), FAYON (F.), ROCHE (D.), PERSON (A.), MORIN (G.), GUILLAUMET (M.), BLANCHARD (M.), LAZZERI (M.) et BABONNEAU (F.). – *A carbonate-fluoride defect model for carbonate-rich fluorapatite.* American Mineralogist 98 1066-1069 (2013).
- [125] PETRICEK (V.), DUSEK (M.) et PALATINUS (L.). – *Crystallographic Computing System JANA2006 : General features.* Zeitschrift Fur Kristallographie 229(5) 345-352 (2014).
- [126] MOORE (J.R.), GARRIDO (L.) et ACKERMAN (J.L.). – *Solid state phosphorus-31 magnetic resonance imaging of bone mineral.* Magnetic resonance in medicine 33(3) 293-9 (1995).
- [127] SFIHI (H.) et REY (C.). – *1-D and 2-D Double Heteronuclear Magnetic Resonance Study of the Local Structure of Type B Carbonate Fluoroapatite, in : J. Fraissard, O. Lapina (Eds.). Magnetic Resonance in Colloid and Interface Science, Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 409-422 (2002).*
- [128] WU (Y.T.), ACKERMAN (J.L.), KIM (H.M.), REY (C.), BARROUG (A.) et GLIMCHER (M.J.). – *Nuclear magnetic resonance spin-spin relaxation of the crystals of bone, dental enamel, and synthetic hydroxyapatites.* Journal of Bone and Mineral Research 17(3) 472-480 (2002).
- [129] VON EUW (S.), AJILI (W.), CHAN-CHANG (T.H.C.), DELICES (A.), LAURENT (G.), BABONNEAU (F.), NASSIF (N.) et AZAÏS (T.). – *Amorphous surface layer versus transient amorphous precursor phase in bone – A case study investigated by solid-state NMR spectroscopy.* Acta Biomaterialia 59 351-360 (2017).
- [130] EICHERT (D.). – *Étude de la réactivité de surface d'apatites de synthèse nanocristallines.* Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse (2001).
- [131] REY (C.), COMBES (C.), DROUET (C.) et GLIMCHER (M.). – *Bone mineral : update on chemical composition and structure.* Osteoporosis International 20(6) 1013-1021 (2009).
- [132] SCHERRER (P.). – *Estimation of the size and internal structure of colloidal particles by means of röntgen.* Nachr. Ges. Wiss. Göttingen 2 96-100 (1918).
- [133] EICHERT (D.), DROUET (C.), SFIHI (H.), REY (C.) et COMBES (C.). – *Nanocrystalline apatite-based biomaterials : synthesis, processing and characterization.* Biomaterials Research Advances 93 (2008).
- [134] CHARLOT (G.). – *Chimie analytique quantitative.* Masson et Cie ed., Paris (1974).
- [135] GEE (A.) et DEITZ (V.R.). – *Determination of phosphate by differential spectrophotometry.* Analytical Chemistry 25(9) 1320-1324 (1953).
- [136] HUFFMAN (E.W.). – *Performance of a new automatic carbon dioxide coulometer.* Microchemical Journal 22(4) 567-573 (1977).
- [137] GRUNENWALD (A.), KEYSER (C.), SAUTEREAU (A.M.), CRUBEZY (E.), LUDÉ (B.) et DROUET (C.). – *Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals : a validated FTIR methodology.* Journal of Archaeological Science 49 134-141 (2014).
- [138] FEATHERSTONE (J.D.B.), PEARSON (S.) et LEGEROS (R.Z.). – *An infrared method for quantification of carbonate in carbonated apatites.* Caries Research 18(1) 63-66 (1984).
- [139] WIESENDANGER (R.). – *Scanning probe microscopy and spectroscopy : methods and applications.* Cambridge University Press (1994).
- [140] ROBINSON (C.), CONNELL (S.), BROOKES (S.), KIRKHAM (J.), SHORE (R.) et SMITH (D.). – *Surface chemistry of enamel apatite during maturation in relation to pH : implications for protein removal and crystal growth.* Archives of Oral Biology 50(2) 267-270 (2005).
- [141] ONUMA (K.), ITO (A.), TATEISHI (T.) et KAMEYAMA (T.). – *Growth kinetics of hydroxyapatite crystal revealed by atomic force*

- microscopy. *Journal of Crystal Growth* 154(1-2) 118-125 (1995).
- [142] McELDERRY (J.-D.P.), ZHU (P.), MROUE (K.H.), XU (J.), PAVAN (B.), FANG (M.), ZHAO (G.), McNERNY (E.), KOHN (D.H.) et FRANCESCHI (R.T.). – *Crystallinity and compositional changes in carbonated apatites: evidence from 31 P solid-state NMR, Raman, and AFM analysis*. *Journal of Solid State Chemistry* 206 192-198 (2013).
- [143] SATO (M.), SLAMOVICH (E.B.) et WEBSTER (T.J.). – *Enhanced osteoblast adhesion on hydrothermally treated hydroxyapatite/titania/poly (lactide-co-glycolide) sol-gel titanium coatings*. *Biomaterials* 26(12) 1349-1357 (2005).
- [144] SIEDLECKI (C.A.) et MARCHANT (R.E.). – *Atomic force microscopy for characterization of the biomaterial interface*. *Biomaterials* 19(4) 441-454 (1998).
- [145] JIANG (W.), PAN (H.), CAI (Y.), TAO (J.), LIU (P.), XU (X.) et TANG (R.). – *Atomic force microscopy reveals hydroxyapatite-citrate interfacial structure at the atomic level*. *Langmuir* 24(21) 12446-12451 (2008).
- [146] WALLWORK (M.L.), KIRKHAM (J.), ZHANG (J.), SMITH (D.A.), BROOKES (S.J.), SHORE (R.C.), WOOD (S.R.), RYU (O.) et ROBINSON (C.). – *Binding of matrix proteins to developing enamel crystals: an atomic force microscopy study*. *Langmuir* 17(8) 2508-2513 (2001).
- [147] SARDA (S.), TOFIGHI (A.), HOBATHO (M.C.), LEE (D.) et REY (C.). – *Associations of low temperature apatite ceramics and proteins*. *Phosphorus Research Bulletin* 10 208-213 (1999).
- [148] DROUET (C.), LARGEOT (C.), RAIMBEAUX (G.), ESTOURNES (C.), DECHAMBRE (G.), COMBES (C.) et REY (C.). – *Bioceramics: spark plasma sintering (SPS) of calcium phosphates*. *Adv. Sci. Technol. (Stafa-Zuerich, Switz.)* 49(Materials in Clinical Applications VII) 45-50 (2006).
- [149] ORTALI (C.), JULIEN (I.), VANDENHENDE (M.), DROUET (C.) et CHAMPION (E.). – *Consolidation of bone-like apatite bioceramics by spark plasma sintering (SPS) of amorphous carbonated calcium phosphate at very low temperature*. *Journal of the European Ceramic Society* (2017).
- [150] BROUILLET (F.), LAURENCIN (D.), GROSSIN (D.), DROUET (C.), ESTOURNES (C.) et CHEVALLIER (G.). – *C. REY, Biomimetic apatite-based composite materials obtained by spark plasma sintering (SPS): physicochemical and mechanical characterizations*. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 26(8) (2015).
- [151] JACQUART (S.), POQUILLON (D.), DECHAMBRE (G.), CAZALBOU (S.), REY (C.) et COMBES (C.). – *Mechanical properties of self-setting composites: influence of the carboxymethylcellulose content and hydration state*. *Journal of Materials Science* 51(9) 4296-4305 (2016).
- [152] GROSSIN (D.), BANU (M.), SARDA (S.), MARTINET-ROLLIN (S.), DROUET (C.), ESTOURNES (C.), CHAMPION (E.), ROSSIGNOL (F.), COMBES (C.) et REY (C.). – *Low Temperature Consolidation of Nanocrystalline Apatites Toward a New Generation of Calcium Phosphate Ceramics*. *Advances in Bioceramics and Porous Ceramics II*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 113-126 (2009).
- [153] ASCENZI (A.) et BONUCCI (E.). – *The tensile properties of single osteons*. *Anat Rec* 158(4) 375-86 (1967).
- [154] BROWN (W.E.a.C.). – *A new calcium phosphate, water-setting cement, in: P.W. Brown (Ed.)*. The American Ceramic Society, pp. 352-379 (1987).
- [155] CONSTANTZ (B.R.), ISON (I.C.), FULMER (M.T.), POSER (R.D.), SMITH (S.T.), VANWAGONER (M.), ROSS (J.), GOLDSTEIN (S.A.), JUPITER (J.B.) et ROSENTHAL (D.I.). – *Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone*. *Science* 267(5205) 1796-9 (1995).
- [156] HATIM (Z.), FRECHE (M.), KHERIBECH (A.) et LACOUT (J.L.). – *The setting mechanisms of a phosphocalcium biological cement*. *Annales De Chimie-Science Des Materiaux* 23 65-68 (1998).
- [157] DE MAEYER (E.A.), VERBEECK (R.M.) et VERCRUYSSSE (C.W.). – *Conversion of octacalcium phosphate in calcium phosphate cements*. *Journal of Biomedical Materials Research* 52 95-106 (2000).
- [158] COMBES (C.), BAREILLE (R.) et REY (C.). – *Calcium carbonate-calcium phosphate mixed cement compositions for bone reconstruction*. *J Biomed Mater Res A* 79(2) 318-28 (2006).
- [159] LEE (D.D.), REY (C.), AILOVA (M.) et TOFIGHI (A.). – *Methods and products related to the physical conversion of reactive amorphous calcium phosphate*. *Google Patents* (2000).
- [160] GINEBRA (M.P.), FERNANDEZ (E.), DE MAEYER (E.A.), VERBEECK (R.M.), BOLTONG (M.G.), GINEBRA (J.), DRIESSENS (F.C.) et PLANELL (J.A.). – *Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement*. *J Dent Res* 76(4) 905-12 (1997).
- [161] KON (M.), MIYAMOTO (Y.), ASAOKA (K.), ISHIKAWA (K.) et LEE (H.H.). – *Development of calcium phosphate cement for rapid crystallization to apatite*. *Dental Materials Journal* 17 223-232 (1998).
- [162] DOS SANTOS (L.A.), DE OLIVERIA (L.C.), RIGO (E.C.), CARRODEGUAS (R.G.), BOSCHI (A.O.) et DE ARRUDA (A.C.). – *Influence of polymeric additives on the mechanical properties of alpha-tricalcium phosphate cement*. *Bone* 25 99S-102S (1999).
- [163] BAROUD (G.), SWANSON (T.) et STEFFEN (T.). – *Setting properties of four acrylic and two calcium-phosphate cements used in vertebroplasty*. *J Long Term Eff Med Implants* 16(1) 51-9 (2006).
- [164] BOHNER (M.). – *New hydraulic cements based on alpha-tricalcium phosphate-calcium sulfate dihydrate mixtures*. *Biomaterials* 25 741-749 (2004).
- [165] MIRTCHI (A.A.), LEMAITRE (J.) et HUNTING (E.). – *Calcium phosphate cements: action of setting regulators on the properties of the [beta]-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements*. *Biomaterials* 10 634-638 (1989).
- [166] WEINER (S.) et TRAUB (W.). – *Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils*. *FEBS Lett* 206(2) 262-6 (1986).
- [167] VENUGOPAL (J.), PRABHAKARAN (M.P.), ZHANG (Y.), LOW (S.), CHOON (A.T.) et RAMAKRISHNA (S.). – *Biomimetic hydroxyapatite-containing composite nanofibrous substrates for bone tissue engineering*. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* 368(1917) 2065 (2010).
- [168] TAMPIERI (A.), CELOTTI (G.), LANDI (E.), SANDRI (M.), ROVERI (N.) et FALINI (G.). – *Biologically inspired synthesis of bone-like composite: self-assembled collagen fibers/hydroxyapatite nanocrystals*. *J Biomed Mater Res A* 67(2) 618-25 (2003).
- [169] VINOY (T.), DEAN (D.R.) et VOHRA (Y.K.). – *Nanostructured Biomaterials for Regenerative Medicine*. *Current Nanoscience* 2(3) 155-177 (2006).
- [170] DU (C.), CUI (F.Z.), ZHU (X.D.) et DE GROOT (K.). – *Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture*. *J Biomed Mater Res* 44(4) 407-15 (1999).
- [171] KIKUCHI (M.), ITOH (S.), ICHINOSE (S.), SHINOMIYA (K.) et TANAKA (J.). – *Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo*. *Biomaterials* 22(13) 1705-11 (2001).
- [172] LI (C.), VEPARI (C.), JIN (H.-J.), KIM (H.J.) et KAPLAN (D.L.). – *Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering*. *Biomaterials* 27(16) 3115-3124 (2006).
- [173] RUSU (V.M.), NG (C.-H.), WILKE (M.), TIERSCH (B.), FRATZL (P.) et PETER (M.G.). – *Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-inorganic composite materials*. *Biomaterials* 26(26) 5414-5426 (2005).
- [174] YAMAGUCHI (I.), TOKUCHI (K.), FUKUZAKI (H.), KOYAMA (Y.), TAKAKUDA (K.), MONMA (H.) et TANAKA (J.). – *Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites*. *Journal of Biomedical Materials Research* 55(1) 20-27 (2001).
- [175] LIAO (S.S.), CUI (F.Z.), ZHANG (W.) et FENG (Q.L.). – *Hierarchically biomimetic bone scaffold materials: nano-HA/collagen/PLA composite*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 69(2) 158-65 (2004).
- [176] PRABHAKARAN (M.P.), VENUGOPAL (J.) et RAMAKRISHNA (S.). – *Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering*. *Acta Biomaterialia* 5(8) 2884-2893 (2009).
- [177] NGIAM (M.), LIAO (S.), PATIL (A.J.), CHENG (Z.), CHAN (C.K.) et RAMAKRISHNA (S.). – *The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering*. *Bone* 45(1) 4-16.
- [178] WEI (G.) et MA (P.X.). – *Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering*. *Biomaterials* 25(19) 4749-4757 (2004).
- [179] SCHARDOSIM (M.), SOULIÉ (J.), POQUILLON (D.), CAZALBOU (S.), DUPLOYER (B.), TENAILLEAU (C.), REY (C.), HÜBLER (R.) et COMBES (C.). – *Freeze-casting for PLGA/carbonated apatite composite scaffolds: Structure and properties*. *Materials Science and Engineering: C* 77 731-738 (2017).
- [180] LIUYUN (J.), YUBAO (L.) et CHENGDONG (X.). – *Preparation and biological properties of a novel composite scaffold of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose for bone tissue engineering*. *Journal of Biomedical Science* 16(1) 65-65 (2009).
- [181] PETRAUSKAITE (O.), GOMES (P.d.S.), FERNANDES (M.H.), JUODZBALYS (G.), STUMBRAS (A.), MAMINSKAS (J.), LIESIENE (J.) et CICCI (M.). – *Biomimetic Mineralization on a*

- Macroporous Cellulose-Based Matrix for Bone Regeneration*. BioMed Research International 2013 9 (2013).
- [182] TADIC (D.), BECKMANN (F.), SCHWARZ (K.) et EPPEL (M.). – *A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering*. Biomaterials 25(16) 3335-3340 (2004).
- [183] YANG (F.), BOTH (S.K.), YANG (X.), WALBOOMERS (X.F.) et JANSEN (J.A.). – *Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application*. Acta Biomaterialia 5(9) 3295-3304 (2009).
- [184] WANG (H.N.), LI (Y.B.), ZUO (Y.), CHENG (L.), WANG (Y.Y.) et LI (H.). – *Nano-Hydroxyapatite/Polymer Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering*. Key Engineering Materials 330-332 365-368 (2007).
- [185] JIE (W.), YUBAO (L.), WEIQUN (C.) et YI (Z.). – *A study on nano-composite of hydroxyapatite and polyamide*. Journal of Materials Science 38 3303-3306 (2003).
- [186] MATHIEU (L.M.), MUELLER (T.L.), BOURBAN (P.-E.), PIOLETTI (D.P.), MÜLLER (R.) et MÂN-SON (J.-A.E.). – *Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials 27(6) 905-916 (2006).
- [187] KOKUBO (T.), ITO (S.), HUANG (Z.T.), HAYASHI (T.), SAKKA (S.), KITSUGI (T.) et YAMAMURO (T.). – *Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W*. J Biomed Mater Res 24(3) 331-43 (1990).
- [188] PATTANAYAK (D.K.), YAMAGUCHI (S.), MATSUSHITA (T.), NAKAMURA (T.) et KOKUBO (T.). – *Apatite-forming ability of titanium in terms of pH of the exposed solution*. Journal of the Royal Society Interface 9(74) 2145-2155 (2012).
- [189] TANAHASHI (M.), YAO (T.), KOKUBO (T.), MINODA (M.), MIYAMOTO (T.), NAKAMURA (T.) et YAMAMURO (T.). – *Apatite coated on organic polymers by biomimetic process: improvement in its adhesion to substrate by NaOH treatment*. J Appl Biomater 5(4) 339-47 (1994).
- [190] LI (F.), FENG (Q.L.), CUI (F.Z.), LI (H.D.) et SCHUBERT (H.). – *A simple biomimetic method for calcium phosphate coating*. Surface and Coatings Technology 154(1) 88-93 (2002).
- [191] BARRERE (F.), VAN BLITTERSWIJK (C.A.), DE GROOT (K.) et LAYROLLE (P.). – *Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFX5 solution*. Biomaterials 23(9) 1921-1930 (2002).
- [192] NIJHUIS (A.W.G.), NEJADNIK (M.R.), NUDELMAN (F.), WALBOOMERS (X.F.), TE RIET (J.), HABIBOVIC (P.), TAHMASEBI BIRGANI (Z.), LI (Y.), BOMANS (P.H.H.), JANSEN (J.A.), SOMMERDIJK (N.A.J.M.) et LEEUWENBURGH (S.C.G.). – *Enzymatic pH control for biomimetic deposition of calcium phosphate coatings*. Acta Biomaterialia 10(2) 931-939 (2014).
- [193] BIGI (A.), BOANINI (E.), BRACCI (B.), FACCHINI (A.), PANZAVOLTA (S.), SEGATTI (F.) et STURBA (L.). – *Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method*. Biomaterials 26(19) 4085-9 (2005).
- [194] BRACCI (B.), PANZAVOLTA (S.) et BIGI (A.). – *A new simplified calcifying solution to synthesize calcium phosphate coatings*. Surface and Coatings Technology 232 13-21 (2013).
- [195] FUJISHIRO (Y.), YABUKI (H.), KAWAMURA (K.), SATO (T.) et OKUWAKI (A.). – *Preparation of needle-like hydroxyapatite by homogeneous precipitation under hydrothermal conditions*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 57(4) 349-353 (1993).
- [196] ARCE (H.), MONTERO (M.L.), SAENZ (A.) et CASTANO (V.M.). – *Hydroxyapatite coatings on metals from calcium-EDTA-phosphate homogeneous solutions*. International Journal of Materials and Product Technology 30(4) 408-418 (2007).
- [197] MIYAZAKI (H.), MAEDA (H.), YOSHIDA (S.), SUZUKI (H.) et OTA (T.). – *Deposition of hydroxyapatite thin films from saturated calcium phosphate solution by controlling the substrate temperature*. Journal of the Ceramic Society of Japan 122(1429) 835-837 (2014).
- [198] GÓMEZ MORALES (J.), RODRIGUEZ CLEMENTE (R.), ARMAS (B.), COMBESCURE (C.), BERJOAN (R.), CUBO (J.), MARTINEZ (E.), GARCIA CARMONA (J.), GARELIK (S.), MURTRA (J.) et MURAVIEV (D.N.). – *Controlled nucleation and growth of thin hydroxyapatite layers on titanium implants by using induction heating technique*. Langmuir 20(13) 5174-8 (2004).
- [199] BRINKER (C.J.), FRYE (G.C.), HURD (A.J.) et ASHLEY (C.S.). – *Fundamentals of sol-gel dip coating*. Thin Solid Films 201(1) 97-108 (1991).
- [200] MALAKAUSKAITE-PETRULEVICIENE (M.), STANKEVICIUTE (Z.), BEGANSKIENE (A.) et KAREIVA (A.). – *Sol-gel synthesis of calcium hydroxyapatite thin films on quartz substrate using dip-coating and spin-coating techniques*. Journal of Sol-Gel Science and Technology 71(3) 437-446 (2014).
- [201] ROEST (R.), LATELLA (B.A.), HENESS (G.) et BEN-NISSAN (B.). – *Adhesion of sol-gel derived hydroxyapatite nanocoatings on anodized pure titanium and titanium (Ti6Al4V) alloy substrates*. Surface and Coatings Technology 205(11) 3520-3529 (2011).
- [202] KERGOURLAY (E.), GROSSIN (D.), CINCA (N.), JOSSE (C.), DOSTA (S.), BERTRAND (G.), GARCIA (I.), GUILLEMANY (J.M.) et REY (C.). – *First Cold Spraying of Carbonated Biomimetic Nanocrystalline Apatite on Ti6Al4V: Physical-Chemical, Microstructural, and Preliminary Mechanical Characterizations*. Advanced Engineering Materials 18(4) 496-500 (2016).
- [203] BESRA (L.) et LIU (M.). – *A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD)*. Progress in Materials Science 52(1) 1-61 (2007).
- [204] BOCCACCINI (A.R.), KEIM (S.), MA (R.), LI (Y.) et ZHITOMIRSKY (I.). – *Electrophoretic deposition of biomaterials*. Journal of the Royal Society, Interface 7(May) S581-S613 (2010).
- [205] KUO (M.C.) et YEN (S.K.). – *The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature*. Materials Science and Engineering: C 20(1a "2) 153-160 (2002).
- [206] DROUET (C.), AL-KATTAN (A.), CHOIMET (M.), TOURRETTE (A.), SANTRAN (V.), DEXPERT-GHYS (J.), PIPY (B.), BROUILLET (F.) et TOURBIN (M.). – *Biomimetic Apatite-Based Functional Nanoparticles as Promising Newcomers in Nanomedicine: Overview of 10 Years of Initiatory Research*. HSOA Journal of General Practice and Medical Diagnosis (GPMD) 1(1) 1-9 (2015).
- [207] ANTONY (A.C.). – *The biological chemistry of folate receptors*. Blood 79(11) 2807-2820 (1992).
- [208] IAFISCO (M.), MANUEL DELGADO-LOPEZ (J.), VARONI (E.M.), TAMPIERI (A.), RIMONDINI (L.), GOMEZ-MORALES (J.) et PRAT (M.). – *Cell Surface Receptor Targeted Biomimetic Apatite Nanocrystals for Cancer Therapy*. Small 9(22) 3834-3844 (2013).
- [209] IAFISCO (M.) et MARGIOTTA (N.). – *Silica xerogels and hydroxyapatite nanocrystals for the local delivery of platinum-bisphosphonate complexes in the treatment of bone tumors: A mini-review*. Journal of Inorganic Biochemistry 117 237-247 (2012).
- [210] PALAZZO (B.), IAFISCO (M.), LAFORGIA (M.), MARGIOTTA (N.), NATILE (G.), BIANCHI (C.L.), WALSH (D.), MANN (S.) et ROVERI (N.). – *Biomimetic hydroxyapatite-drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties*. Advanced Functional Materials 17(13) 2180-2188 (2007).
- [211] HOSSAIN (S.), YAMAMOTO (H.), CHOWDHURY (E.H.), WU (X.), HIROSE (H.), WAQUE (A.), DOKI (Y.), MORI (M.) et AKAIKE (T.). – *Fabrication and Intracellular Delivery of Doxorubicin/Carbonate Apatite Nanocomposites: Effect on Growth Retardation of Established Colon Tumor*. PLoS ONE 8(4) e60428 (2013).
- [212] BOULADJINE (A.), AL-KATTAN (A.), DUFOUR (P.) et DROUET (C.). – *New Advances in Nanocrystalline Apatite Colloids Intended for Cellular Drug Delivery*. Langmuir 25(20) 12256-12265 (2009).
- [213] HOSSAIN (S.), STANISLAUS (A.), CHUA (M.J.), TADA (S.), TAGAWA (Y.-I.), CHOWDHURY (E.H.) et AKAIKE (T.). – *Carbonate apatite-facilitated intracellularly delivered siRNA for efficient knockdown of functional genes*. Journal of Controlled Release 147(1) 101-108 (2010).
- [214] SOKOLOVA (V.V.), RADTKE (I.), HEUMANN (R.) et EPPEL (M.). – *Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles*. Biomaterials 27(16) 3147-3153 (2006).
- [215] WELZEL (T.), RADTKE (I.), MEYER-ZAIKA (W.), HEUMANN (R.) et EPPEL (M.). – *Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA*. Journal of Materials Chemistry 14(14) 2213-2217 (2004).
- [216] AL-KATTAN (A.), SANTRAN (V.), DUFOUR (P.), DEXPERT-GHYS (J.) et DROUET (C.). – *Novel contributions on luminescent apatite-based colloids intended for medical imaging*. Journal of Biomaterials Applications 28(5) 697-707 (2014).
- [217] AL-KATTAN (A.), DUFOUR (P.), DEXPERT-GHYS (J.) et DROUET (C.). – *Preparation and Physicochemical Characteristics of Luminescent Apatite-Based Colloids*. Journal of Physical Chemistry C 114(7) 2918-2924 (2010).
- [218] SANDHOEFER (B.), MECKEL (M.), MANUEL DELGADO-LOPEZ (J.), PATRICIO (T.), TAMPIERI (A.), ROESCH (F.) et IAFISCO (M.). – *Synthesis and Preliminary in Vivo Evaluation of Well-Dispersed Biomimetic Nanocrystalline Apatites Labeled with Positron Emission Tomographic Imaging Agents*. ACS Applied Materials & Interfaces 7(19) 10623-10633 (2015).
- [219] OLTOLINA (F.), GREGOLETTO (L.), COLANGELO (D.), GOMEZ-MORALES (J.), MANUEL

DELGADO-LOPEZ (J.) et PRAT (M.). – *Monoclonal Antibody-Targeted Fluorescein-5-iodo-thiocyanate-Labeled Biomimetic Nanoapatites: A Promising Fluorescent Probe for Imaging Applications*. Langmuir 31(5) 1766-1775 (2015).

[220] STEFANIC (M.), WARD (K.), TAWFIK (H.), SEEMANN (R.), BAULIN (V.), GUO (Y.), FLEURY (J.-B.) et DROUET (C.). – *Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating trehalose delivery via enhanced membrane permeation*. Biomaterials 140 138-149 (2017).

[221] MONDEJAR (S.P.), KOVTUN (A.) et EPPEL (M.). – *Lanthanide-doped calcium phosphate nanoparticles with high internal crystallinity and with a shell of DNA as fluorescent probes in cell experiments*. Journal of Materials Chemistry 17(39) 4153-4159 (2007).

[222] CHOIMET (M.), KIM (H.-M.), OH (J.-M.), TOURRETTE (A.) et DROUET (C.). – *Nanomedicine: Interaction of biomimetic apatite colloidal nanoparticles with human blood components*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 145 87-94 (2016).

[223] RAMIREZ RODRIGUEZ (G.), DELGADO-LÓPEZ (J.M.), IAFISCO (M.), SHANKAR (G.), MONTESI (M.), PANSERI (S.), SANDRI (M.), SPRIO (S.), KLUIJTMANS (B.) et TAMPIERI (A.). – *Biomimetic mineralization of synthetic collagen-like peptide: a bottom-up approach to design advanced nanocomposite scaffolds for tissue engineering*. Front. Bioeng. Biotechnol. Conf. Abstract (2016).

[224] REY (C.) et al. – *Characterization of Calcium Phosphate Using Vibrational Spectroscopies*. B Ben-Nissan (Ed), Advanced in Calcium Phosphate Biomaterials, Springer Berlin Heidelberg (2014), pp. 229-266.

À lire également dans nos bases

BERTOLUS (M.) et DEFRANCESCHI (M.). – *Les apatites: des phosphates naturels*. Biomédical-Pharma [AF 6610] (2015).

COMBES (C.) et REY (C.). – *Biomatériaux à base de phosphates de calcium*. Biomédical-Pharma [N4950] (2013).

GRÉMILLARD (L.) et CHEVALIER (J.). – *Matériaux céramiques pour les prothèses orthopédiques*. Biomédical-Pharma [MED7100] (2016).

LEFORT (P.) et VALETTE (S.). – *Cinétique des réactions du solide à températures élevées- Notions*

de base et processus élémentaires. Sciences fondamentales [AF3688] (2009).

Normes et standards

ISO 13779-2	2008	Implants chirurgicaux – Hydroxyapatite – Partie 2 : Revêtements à base d'hydroxyapatite	ISO 13175-3	2012	Implants chirurgicaux – Phosphates de calcium – Partie 3 : substituts osseux à base d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique bêta
ISO 13779-3	2008	Implants chirurgicaux – Hydroxyapatite – Partie 3 : Analyse chimique et caractérisation de la cristallinité et de la pureté de phase	ISO 10993-18	2005	Évaluation biologique des dispositifs médicaux – Partie 18 : caractérisation chimique des matériaux
ISO 13779-4	2002	Implants chirurgicaux – Hydroxyapatite – Partie 4 : Détermination de la résistance à l'adhésion du revêtement	ISO 17327-1	2018	Implants chirurgicaux non actifs – Revêtement de l'implant – Partie 1 : Exigences générales
ISO 13779-6	2015	Implants chirurgicaux – Hydroxyapatite – Partie 6 : poudres			

Logiciels

Therm'AP

<http://www.christophedrouet.com/thermAP.html>