



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Science et Génie des Matériaux

Présentée et soutenue par :

M. PIERRE GRAS

le mardi 14 octobre 2014

Titre :

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET STRUCTURALE DE
PYROPHOSPHATES DE CALCIUM HYDRATES: APPLICATION AUX
MICRO-CALCIFICATIONS ASSOCIEES A L'ARTHROSE

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

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

Directeur(s) de Thèse :

MME CHRISTELE COMBES

MME STÉPHANIE SARDA

Rapporteurs :

M. DANIEL CHATEIGNER, UNIVERSITE DE CAEN

M. PETROS KOUTSOUKOS, PANEPISTIMIO PATRON (PATRAS)

Membre(s) du jury :

Mme BEATRICE BISCANS, INP TOULOUSE, Président

M. CHRISTIAN REY, INP TOULOUSE, Membre

M. ERIC OELKERS, OBSERVATOIRE MIDI PYRENEES, Membre

Mme CHRISTELE COMBES, INP TOULOUSE, Membre

Mme ELISA BOANINI, UNIVERSITA DEGLI STUDI DE BOLOGNE, Membre

M. MICHEL DAUDON, HOPITAL TENON AP-HP, Membre

Remerciements

Voici sans doute la partie la plus personnelle et la plus difficile à rédiger de cette thèse : les remerciements chaleureux aux nombreuses personnes qui ont participé à cette thèse, par leur aide, leur conseil et leur soutien, créant un cocon de chaleur humaine et de rigueur scientifique pas forcément incompatible.

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe « Phosphates, Pharmacotechnie, Biomatériaux » du Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux, de Toulouse.

Je tiens d'abord à remercier les personnes ayant acceptées de juger cette thèse et d'apporter leur regard pluridisciplinaire sur ce travail.

Béatrice Biscans, Directrice de Recherche CNRS, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse et bien plus au cours de cette thèse, apportant son regard critique, sa rigueur et sa bonne humeur au cours de ces trois ans.

Daniel Chateigner, Professeur à l'Université de Caen, pour votre regard de cristallographe et la relecture très attentive du manuscrit.

Et *Petros Koutsoukos*, Professeur à l'Université de Patras, concernant la croissance cristalline, σας ευχαριστώ.

Merci d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit et ainsi de l'améliorer par vos commentaires toujours très éclairés et vos corrections plus que pertinentes.

Elisa Boanini, de l'Université de Bologne, pour votre analyse fine notamment des différents mécanismes de croissance cristalline.

Michel Daudon, Praticien hospitalier à l'Hôpital Tenon, votre expertise incontestable des minéralisations pathologiques ainsi que votre aide précieuse au cours de ces trois ans de thèse m'ont beaucoup apportées.

Eric Oelkers, Directeur de Recherche CNRS, votre approche et votre point de vue ont permis une mise en perspective globale de ce travail, ce qui fut grandement appréciée.

Je ne pourrais sans doute jamais exprimer la chance que j'ai eu de travailler durant ces trois ans dans ce laboratoire et au sein de cette équipe merveilleuse mais j'espère que ces quelques lignes pourront représenter tout le plaisir et la joie que j'ai ressentis et, parfois mais jamais assez, exprimés « physiquement ».

Christèle Combes, encadrante exceptionnelle, bienveillante, toujours joyeuse et patiente. Des qualités extraordinaires qui font que, malgré un emploi du temps à rallonge, il reste toujours du temps pour nous, les doctorants, nos petits sauts, petits cris et gros délires... Et surtout un immense merci pour toute la confiance que tu nous fais et qui permet de nous exprimer pleinement sur tous les points. Fidèle à la formule : Une formation par les meilleurs, pour pouvoir donner le meilleur.

Stéphanie Sarda, toujours présente malgré la distance, et les défaites répétées de Castres, sa fraîcheur et son analyse critique toujours pertinentes, notamment sur quelques conclusions parfois hâtives, ont rendu les réunions encore plus magiques et les diverses corrections bien plus faciles à appréhender pour moi.

Christian Rey, un puits de science où nous prenons tous plaisir à nous abreuver, mélange magnifique de Panoramix et de Jean Jaurès, dont les potions, les jurons et surtout les discours resteront longtemps gravés dans ma mémoire.

Sébastien Teychené pour son implication, ses idées lumineuses, sa motivation et sa bonne humeur à chacune des étapes de cette thèse et au cours des différents moments partagés dans un cadre plus informel.

Dans le cadre de cette thèse, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec de nombreuses personnes de talents qui, chacun dans leur domaine et plus encore, ont apportées leurs connaissances, leurs expertises pour faire de ce travail un projet toujours plus abouti. Je remercie donc tout particulièrement :

Hang-Korng Ea, Frédéric Lioté et Laure Campillo du Centre Viggo Petersen de l'Hôpital Lariboisière, à Paris, pour tous les aspects biologiques et médicaux de cette thèse.

Dominique Bazin, Christian Bonhomme, Christel Gervais, Laure Bonhomme et Cristina Coelho du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris,

Et *Danielle Laurencin* de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier, pour les analyses par spectroscopie RMN du solide

Erik Elkaim du Synchrotron Soleil, à Saclay, pour la diffraction des rayons X,

Gilles André du Laboratoire Léon Brillouin de Saclay, pour la diffraction des neutrons,

Lydia Laffont du CIRIMAT de Toulouse, pour l'analyse MET et la diffraction électronique

Pierre Lecante du CEMES, à Toulouse, pour la diffusion X à grand angle.

Christine Rey-Rouch du LGC, à Toulouse, pour l'analyse granulométrique,

Et *Nicolas Ratel-Ramond*, du CEMES, qui m'a mis le pied à l'étrier pour la partie cristallographie et a ainsi permis des avancées significatives tout au long de la thèse.

Merci pour tous les échanges que nous avons eu et au cours desquels j'ai énormément appris.

J'ai aussi eu l'honneur d'être accueilli par *Jincheng Du* au sein de son équipe à l'University of North Texas lors d'un séjour de deux mois. L'essentiel des données DFT ont été produites lors de ce séjour. Thank you for welcoming me with such kindness and investment. I was very lucky, not only for the snow in Texas, but to be part of your team for those weeks. I also would like to thank *Ye, Lu, Jessica, Niraj* and *Giulia* for the great times we spent together.

Et *Jérémy Soulié*, du CIRIMAT, qui m'a presque converti au côté amorphe de la force et qui, au cours d'un été un peu fou, a su me faire confiance pour développer un nouveau projet. Et bien sûr, bien plus que cela, en partageant quelques bières, cartons et parties de rugby.

Et bien sûr aucune étude n'aurait pu être réalisée au laboratoire sans l'aide de ceux qui font une grande partie de l'âme de notre équipe :

Cédric Charvillat et *Olivier Marsan*, nos voisins et bien plus que cela. Merci de vos investissements, et d'avoir répondu à toutes mes demandes, toujours plus compliquées, prenant parfois (souvent) plusieurs heures voire jours, en les accompagnants toujours de rire, de grande discussion, de café et de gâteau.

Dominique Bonsirven, merci pour toutes les missions, les (grands) services, les commandes, les petites attentions qui en font un peu la mère des doctorants de l'équipe souvent partis en vadrouille mais pas toujours (r)assurés.

Françoise Bosc pour son aide particulièrement au cours de la première année et notamment dans la gestion des commandes pas forcément évidente.

Gérard Dechambre, que j'ai eu la chance de côtoyer et qui m'a été d'une grande aide dans la mise en place des expériences.

Finalement, tous ceux qui ont embellit mes journées par un conseil, un rire et souvent quelque chose à manger !

Au sein de cette équipe idéale, merci à *Christophe* et *David*, grands gourmands par excellence, *Ghislaine*, pour ces discussions jusqu'au bout de la nuit, *Michèle* et *Jean-Louis* et tous ceux de pharma avec *Audrey*, *Fabien* (bien aussi gourmand), *Sandrine*, *Sophie* et *Sophie*. Votre passion et votre enthousiasme rend chaque rencontre, réunion, visite ou coup de téléphone magique.

Et bien évidemment les doctorants avec qui on partage chaque moment de cette aventure, quelques fois littéralement nuit et jour. Le bureau 1-r1-1 bien sûr, lieu de toutes les aventures, humaines et culinaires, dans la joie et la bonne humeur et ses 5 muses. *Imane*, taquine et généreuse, avec un cœur énorme, *Patricia*, volontaire et gourmande pour tous les aspects de cette nouvelle vie qui commence pour elle, *Sylvaine*, partenaire de tous les délires, généreuse et toujours vraie, *Manu(e)*, joyaux de la mer d'Iroise, avec un sens de l'humour détonnant et *Maëla*, pour ces moments de partage dans une année chargée. Et aussi *Farid*, « chef », *Nicolas*, rockeur au grand cœur, *Marie-Alix*, la grande sœur, *Hassan*, le charmeur, *Audric*, le blagueur, *Frédéric*, la touche québécoise, *Mariane*, a menina alegre et *Eve*, la pétillante, *Sabrina*, *Hélène* et *Anne*, toutes ceux qui ont enrichis chacun à leur manière ce cocon. Et évidemment *Kémie*, énergique et dynamique, repreneuse motivée et motivante d'un sujet passionnant. Bon courage mais je me fais pas trop de soucis.

Et tous les « mémodocs » : *Koenraad*, *Maxime*, *Aurélien*, *Ronan*, *Mathilde*, *Pierre-Luc*, *Clément*, *Aneesha*, *Rosanne*, *Ugras*, *Héloïse*, *Coralie*, *Fatah*, *Omar*, *Alexandre*, *Alexandra*, *Franck*, *Florian*, *Caminde*, *Sheyla*, *Pauline*, *Jean*, *Benoît*, *Olivier*, *Daniel*, *Katia*, *Jany*, *Marie-Laetitia*, *Jacques*, *Loïc* et *Charlotte* qui prouvent que tout le labo bien est exceptionnel. Ainsi que *Audrey*, *Sara*, *Tristan*, *Marc*, *Loïc* car il existe aussi des gens formidables hors du labo.

Merci à *Florentina* pour ces années et bonne chance à toi.

Et je n'oublie pas tous ceux que qui aurait pu se perdre dans ma mémoire mais qui reste dans mon cœur. Ce fut vraiment une chance de travailler dans un tel environnement.

The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries,
is not 'Eureka!' but 'That's funny...'

Isaac Asimov

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I L'arthrose et les pyrophosphates de calcium : Revue bibliographique	I-1
A. L'arthrose et les maladies microcristallines	I-3
A1. Contexte général	I-3
A2. Description de l'articulation arthrosique	I-5
A2 a) Cartilage et ménisque.....	I-5
A2 b) L'os.....	I-6
A2 c) Liquide synovial et membrane synoviale	I-7
A3. Micro-calcifications pathologiques.....	I-9
A3 a) Phosphates de calcium : ortho- et pyrophosphates.....	I-9
A3 b) Les pyrophosphates de calcium dihydratés	I-10
B. Les pyrophosphates de calcium d'intérêt biologiques	I-13
B1. Pyrophosphate : $P_2O_7^{4-}$	I-13
B1 a) Méthodes de synthèse in vitro	I-13
B1 b) Synthèse in vivo et régulation extracellulaire	I-14
B2. Pyrophosphates de calcium hydratés (CPP : $Ca_2P_2O_7 \cdot nH_2O$)	I-15
B2 a) Les premières méthodes de synthèse	I-15
B2 b) Les pyrophosphates de calcium d'intérêt biologique	I-16
C. Conclusions.....	I-20
Chapitre II Synthèse et caractérisation de phases de pyrophosphate de calcium hydraté d'intérêt biologique	II-1
A. Synthèse de pyrophosphates de calcium hydratés.....	II-3
A1. Etat de l'art	II-3
A2. Matériels et méthodes	II-4
A2 a) Protocole de synthèse de pyrophosphates de calcium hydratés.....	II-5
A2 b) Techniques de caractérisation.....	II-6
B. Caractérisation de phases pures de pyrophosphate de calcium hydratés.....	II-6
B1. Diffraction des rayons X.....	II-7
B2. Spectroscopies vibrationnelles : FTIR et Raman.....	II-8
B3. Analyses chimiques.....	II-15
B4. Analyses thermogravimétriques.....	II-17

B5.	Observations microscopiques	II-19
B6.	Surface spécifique.....	II-21
C.	Etude de la formation de pyrophosphate de calcium par double décomposition	II-21
C1.	Domaines de formation.....	II-21
C2.	Etude en concentration pour l'obtention de la phase m-CPPD	II-24
D.	Conclusions.....	II-25
Chapitre III	Caractérisations fines des phases de pyrophosphate de calcium hydratées	III-1
A.	Analyses structurales des phases de pyrophosphate de calcium hydratées	III-4
A1.	Diffraction des rayons X et diffraction des neutrons.....	III-4
A1 a)	Théorie de la diffraction des rayons X sur poudre	III-4
A1 b)	Résolution structurale à partir de diagrammes de diffraction sur poudre	III-4
A2.	Analyse des diagrammes de diffraction des rayons X des phases de pyrophosphate de calcium hydratées.....	III-5
A2 a)	Résolution de la structure de la phase m-CPPD	III-6
A2 b)	Résolution de la structure de la phase t-CPPD	III-30
A2 c)	Résolution de la structure de la phase m-CPPT β et de ses dérivés	III-37
A2 d)	Analyse de la phase amorphe a-CPP par diffusion des rayons X.....	III-52
B.	Analyses spectroscopiques des phases de CPP	III-55
B1.	Spectroscopies Raman et FTIR basse température	III-55
B2.	Spectroscopies par résonance magnétique nucléaire du solide ^{31}P et ^{43}Ca	III-66
C.	Analyses morphologiques des phases de CPP.....	III-69
C1.	Données bibliographiques.....	III-69
C2.	Morphologies des cristaux de CPP	III-71
C3.	Fonctions de Fukui et potentiel inflammatoire	III-85
D.	Conclusions.....	III-91
Chapitre IV	Evolutions et transformations de phases de pyrophosphate de calcium hydratés	IV-1
A.	Cristallisation et évolution des phases de CPP	IV-3
A1.	Evolution de la phase amorphe	IV-3
A1 a)	Etat de l'art	IV-3
A1 b)	Evolution de la phase amorphe en fonction du pH et de la température	IV-4
A1 c)	Evolution à pH et température fixes	IV-8
A2.	Synthèse en gel : cellule de diffusion	IV-16
A2 a)	Etat de l'art	IV-16
A2 b)	Protocole de synthèse par diffusion en gel.....	IV-17

A2 c)	Etudes préliminaires en tube à essai	IV-18
A2 d)	Caractérisation des cristaux obtenus	IV-19
A2 e)	Expériences en cellule de diffusion	IV-24
A3.	Synthèse en réacteur parfaitement agité.....	IV-29
A3 a)	Analyse DRX.....	IV-30
A3 b)	Analyse FTIR.....	IV-31
A3 c)	Analyses thermiques	IV-32
A3 d)	Analyse micrographique MEB	IV-33
B.	Evolution de CPP en température : Etude de la déshydratation et des changements de phase.....	IV-35
B1.	Etat de l'art	IV-35
B2.	Caractérisations des phases hydratées de CPP à hautes températures	IV-36
B2 a)	Analyse thermiques des CPP par ATG/ATD	IV-37
B2 b)	Caractérisation par DRX et spectroscopie FTIR de l'Evolution de la phase m-CPPD en fonction de la température.....	IV-39
B2 c)	Caractérisation par DRX et spectroscopie FTIR de l'Evolution de la phase t-CPPD en température	IV-41
B2 d)	Caractérisation de l'évolution de la phase m-CPPT β en température	IV-43
C.	Conclusions.....	IV-52

Chapitre V Analyse de spécimens biologiques et évaluation *in vitro* des phases de pyrophosphate de calcium hydratées..... V-1

A.	Analyses de ménisques et liquides synoviaux <i>ex vivo</i>	V-3
A1.	Etude bibliographique	V-4
A2.	Analyse par diffraction des rayons X de cristaux issus de ménisque et de liquides synoviaux.....	V-7
A2 a)	Préparation des échantillons.....	V-7
A2 b)	Identification des phases de CPP dans les spécimens biologiques	V-8
A2 c)	Analyse quantitative.....	V-11
A3.	Analyse par spectroscopie Raman de calcifications issues de ménisques et de liquides synoviaux	V-15
A3 a)	Analyse des échantillons de ménisques	V-16
A3 a)	Analyse des échantillons de liquides synoviaux	V-20
A4.	Perspectives : Analyses complémentaires.....	V-22
B.	Analyses des réactions inflammatoires : résultats préliminaires.....	V-23
B1.	Protocole expérimental	V-23
B2.	Résultats préliminaires	V-23
C.	Conclusions.....	V-25

Conclusions générales et Perspectives.....	1
---	----------

Annexes I

A. Techniques de caractérisation.....	III
A1. Diffraction.....	III
A2. Spectroscopie	III
A3. Microscopie	IV
A4. Autres analyses.....	IV
B. Description des diffractomètres utilisés pour l'analyse structurale	VI
B1. Description sommaire des caractéristiques des instruments	VI
B2. Comparaison des diagrammes obtenus	VII
C. Théorie de la diffraction des rayons X sur poudre	XI
C1. Intensité des réflexions observées	XI
C2. Profil de la réflexion.....	XIII
C3. Modélisation du profil	XVI
C4. Modélisation de l'asymétrie	XXI
C5. Facteurs d'accord	XXIII
D. Résolution structurale à partir de diagrammes de diffraction sur poudre	XXVI
D1. Acquisition des données.....	XXVI
D2. Positionnement et intensité des réflexions.....	XXVI
D3. Recherche bibliographique.....	XXVII
D4. Recherche des paramètres de maille	XXVII
D5. Décomposition du profil	XXVIII
D6. Détermination d'un modèle structural	XXX
D7. Affinement structural : Méthode de Rietveld	XXXIII
D8. Densité électronique et théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)	XXXV

Introduction générale

L'arthrose est l'arthropathie la plus répandue affectant 9 à 10 millions de personnes en France, et ce nombre augmente continuellement avec vieillissement de la population. Problème de santé publique majeur provoquant douleur et handicap chez les patients, les causes de la maladie sont encore mal comprises et les différents traitements proposés à ce jour consistent uniquement en des traitements symptomatiques, la solution définitive, radicale et souvent incontournable s'avérant être la pose de prothèse sur l'articulation affectée.

Les microcalcifications pathologiques sont une des complications liées à l'arthrose. Parmi les microcristaux identifiés, les pyrophosphates de calcium hydratés présents dans les articulations de patients arthritiques déclenchent une série de processus biologiques aboutissant à la dégradation progressive de l'articulation. Le lien entre cristaux et réaction inflammatoire est cependant complexe à appréhender et mal compris : la présence de cristaux déclenche une réaction inflammatoire mais la formation de ceux-ci est-elle une cause ou une conséquence de l'inflammation observée au sein de l'articulation ? Comment les cristaux de pyrophosphates se forment dans l'articulation ? Comment interagissent-ils avec le milieu biologique ? Et comment améliorer le diagnostic de ces maladies ?

Contrairement aux orthophosphates de calcium, la physico-chimie des pyrophosphates de calcium est encore peu décrite 50 ans après leur première observation dans le corps humain. La difficulté de synthétiser des composés purs en quantité importante a limité l'étude des différentes phases impliquées dans les processus biologiques ainsi que leurs caractérisations fines. Une meilleure connaissance des phases de pyrophosphate de calcium pourrait cependant améliorer la compréhension des mécanismes d'inflammation et mieux identifier les maladies liées à ces cristaux afin de procurer des éléments de diagnostic et améliorer leur prise en charge médicale.

Ainsi, cette thèse portant sur l'étude de cristaux de pyrophosphate de calcium hydraté, et s'inscrit dans un objectif à moyen terme afin de pouvoir proposer un traitement permettant soit d'empêcher la formation soit de dissoudre les cristaux de pyrophosphate de calcium hydraté et de limiter leur développement. Pour atteindre cet objectif à moyen terme, nous avons besoin de contribuer à une meilleure connaissance de ces phases d'intérêt biologique via la mise au point d'une méthode de préparation d'analogues de synthèse et la caractérisation physico-chimique et structurale fine de ces phases afin d'apporter des éléments aux différentes problématiques soulevées.

Cette thèse a bénéficié d'une bourse de doctorat interne à l'Institut Carnot CIRIMAT et s'inscrit dans le cadre d'une collaboration formalisée autour du projet ANR Blanc CAPYROSIS « Formation

de cristaux de pyrophosphates de calcium et arthrose : études *in vitro* et *in vivo* » (ANR-12-BS08-0022-01, 2013-2017) Ce projet inter- et multidisciplinaire réunit un consortium de quatre partenaires académiques nationaux qui interviennent chacun dans leur cœur de compétences :

1 • Institut Carnot CIRIMAT (Toulouse), coordination du projet, élaboration et caractérisation de différentes phases de pyrophosphates de calcium.

2 • Laboratoire de Génie Chimique (Toulouse) : Etude des mécanismes de nucléation, croissance et solubilité, effets des additifs.

3 • INSERM U606 (Paris) : Etudes biologiques *in vivo* et *in vitro* (spécimens biologiques et analogues synthétiques).

4 • Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (Paris) : Caractérisation fine (spécimens biologiques et analogues synthétiques).

Par ailleurs, l'Institut National Polytechnique de Toulouse a soutenu le financement de la mobilité internationale de P. Gras durant 2 mois (projet BQR SMI 2013) pour initier une collaboration avec le groupe du Dr Jincheng DU du Center for Advanced Scientific Computing and Modeling (CASCaM), University of North Texas (Denton TX, USA) et notamment pour débiter des travaux sur la *modélisation des structures et des surfaces de pyrophosphates de calcium hydratés*.

L'objectif de ce projet est l'étude de différentes phases de pyrophosphate de calcium, par la synthèse et la caractérisation de spécimen synthétiques ainsi que l'analyse de spécimens biologiques présents dans les articulations de patients arthritiques, afin de préciser le rôle de ces cristaux dans les mécanismes liés à l'arthrose.

Dans ce cadre, après quelques notions générales et une revue bibliographique présentées dans le premier chapitre afin de situer la problématique liée aux cristaux de pyrophosphate de calcium et leur rôle dans l'arthrose, nous aborderons dans un deuxième chapitre la mise au point d'un protocole de synthèse des différentes phases de pyrophosphate de calcium hydraté pur.

Les caractérisations fines, structurales, spectroscopiques et morphologiques des différentes phases d'intérêt biologique ainsi obtenues feront l'objet du troisième chapitre. Le quatrième chapitre exposera l'étude des évolutions de phases observées *in vitro*, en s'appuyant sur les caractérisations présentées dans le chapitre précédent. Enfin l'étude de spécimens biologiques et les résultats préliminaires sur l'effet inflammatoire des phases de pyrophosphate de calcium constitueront le dernier chapitre de ce manuscrit.

Chapitre I

L'arthrose et les pyrophosphates de calcium :
Revue bibliographique

Ce chapitre s'attachera à présenter une revue bibliographique sur l'arthrose et les maladies à microcristaux et, traitera, plus spécifiquement, des relations entre cristaux de pyrophosphate de calcium hydraté et arthrose. Nous exposons également l'état de l'art sur les méthodes de synthèse et les caractérisations physico-chimiques et structurales des pyrophosphates de calcium hydratés.

A. L'arthrose et les maladies microcristallines

A1. Contexte général

L'arthrose est la maladie articulaire la plus fréquente, affectant des millions de personnes et jusqu'à 80% de la population au-delà de 75 ans [Fuerst *et al.*, 2009]. Elle touche toutes les articulations, principalement le genou, et toutes les composantes de l'articulation : os, cartilage, ménisques et membrane synoviale (figure I-1).

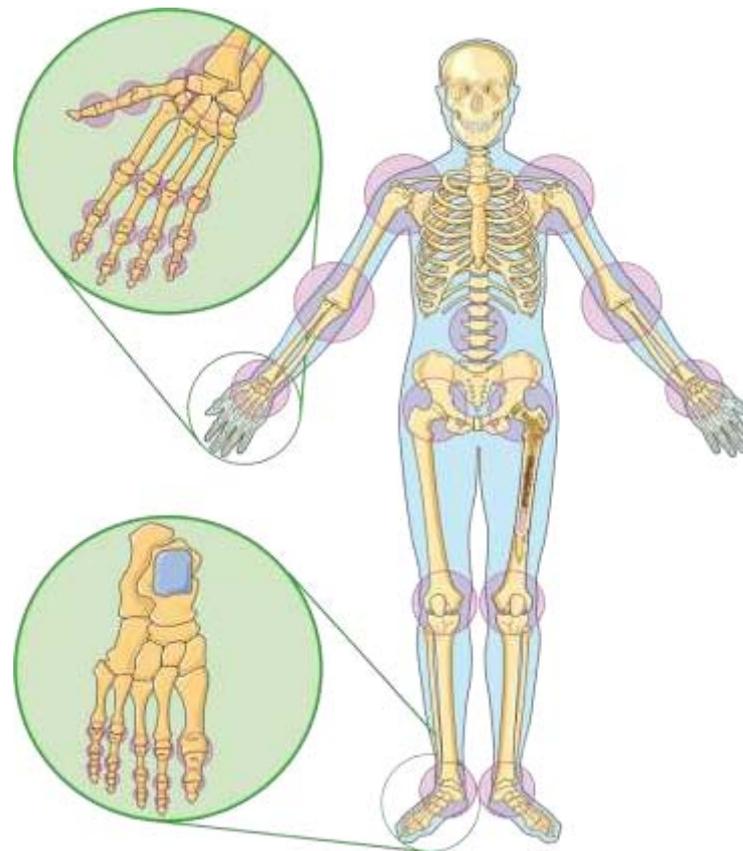
Cette maladie, très handicapante, est associée à plus de 400 000 hospitalisations par an aux Etats-Unis, pour un coût total de 8 milliards de dollars, et donne lieu à une pose de prothèse toutes les 1,5 minutes en Europe (tableau I-1) [Lynch *et al.*, 2009]. Dans une moindre mesure, 80% des patients arthrosiques ressentent une gêne articulaire et 25% ne peuvent plus effectuer correctement les gestes du quotidien, ce qui peut entraîner un isolement social.

Tableau I-1 : Nombre de cas diagnostiqués d'arthrose (en millions) [Decision Resources Inc., 2004].

Pays	2002	2007	2012
Etats-Unis	13,2	14,4	15,5
Europe	14,5	15,2	15,8
Japon	6,6	6,9	7,2
Total	34,3	36,5	38,6

L'arthrose a de multiples origines et divers facteurs aggravants ont été identifiés : hérédité, vieillissement, traumatismes et microtraumatismes répétés, surcharge mécanique et pondérale, diabète et syndrome métabolique [MacMullan *et al.*, 2011]. Elle est caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale, et conduit dans les cas les plus avancés à la destruction du cartilage et l'altération du tissu osseux.

a)



b)

Normal

Arthrose

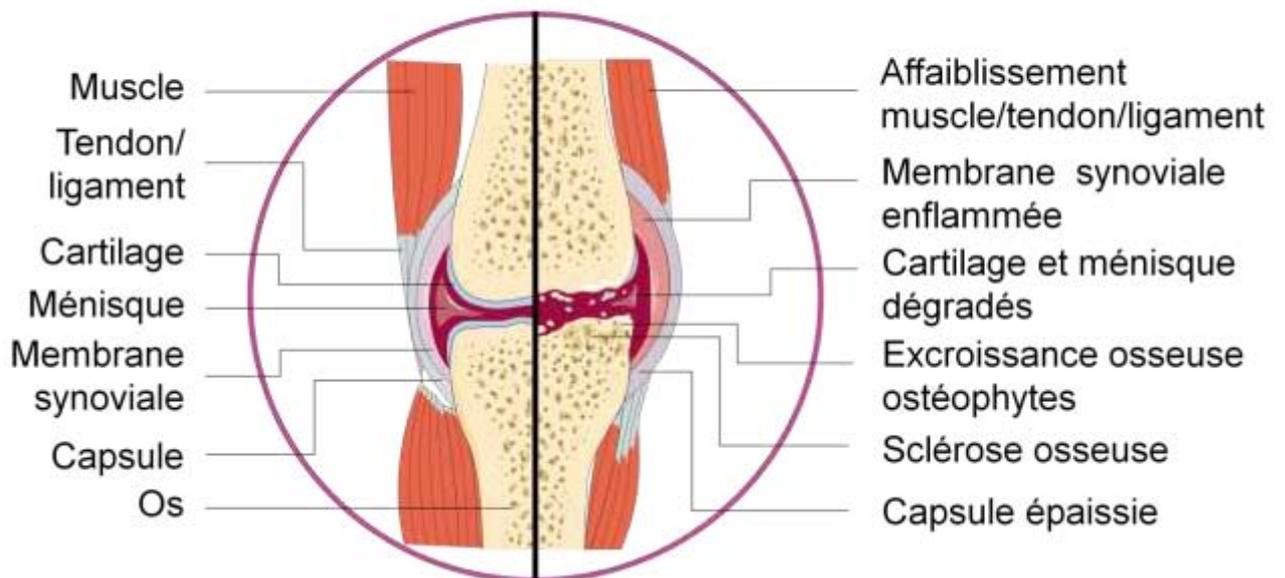


Figure I-1 : a) L'articulation la plus touchée par l'arthrose est le genou ; les hanches, les épaules, la colonne vertébrale, les doigts et les orteils sont plus rarement atteints. b) Tous les tissus de l'articulation sont affectés par l'arthrose. Adapté de Wieland *et al.* [Wieland *et al.*, 2005] et Servier Medical Art (licence Creative Commons Attribution 3.0 France).

A2. Description de l'articulation arthrosique

A2 a) Cartilage et ménisque

Dans les articulations normales, le cartilage recouvre l'extrémité de chaque os. Le cartilage fait office de d'amortisseur mécanique entre les os de l'articulation, empêchant ainsi les dommages causés par les charges biomécaniques. Le cartilage est principalement composé d'eau associée à une matrice organique de collagène, de protéoglycanes et de cellules, les chondrocytes. Le réseau de protéoglycanes polyanionique est essentiel pour les propriétés biomécaniques du cartilage, la haute densité de charges négatives leur permet d'attirer les molécules d'eau. Les protéoglycanes sont présentes dans le cartilage sous forme d'aggrécane, constitué branches de glycoaminoglycanes, sulfate de chondroïtine sulfate et sulfate de kératane greffées sur un cœur protéique. La protéine porte 100 à 200 chaînes de glycoaminoglycanes, chaque monomère est lié à une chaîne d'hyaluronane par le biais d'une protéine de liaison. Un complexe d'aggrécane peut compter jusqu'à 100 monomères liés au même hyaluronane. L'ensemble est entremêlé aux fibres de collagène dans le cartilage (figure I-2).

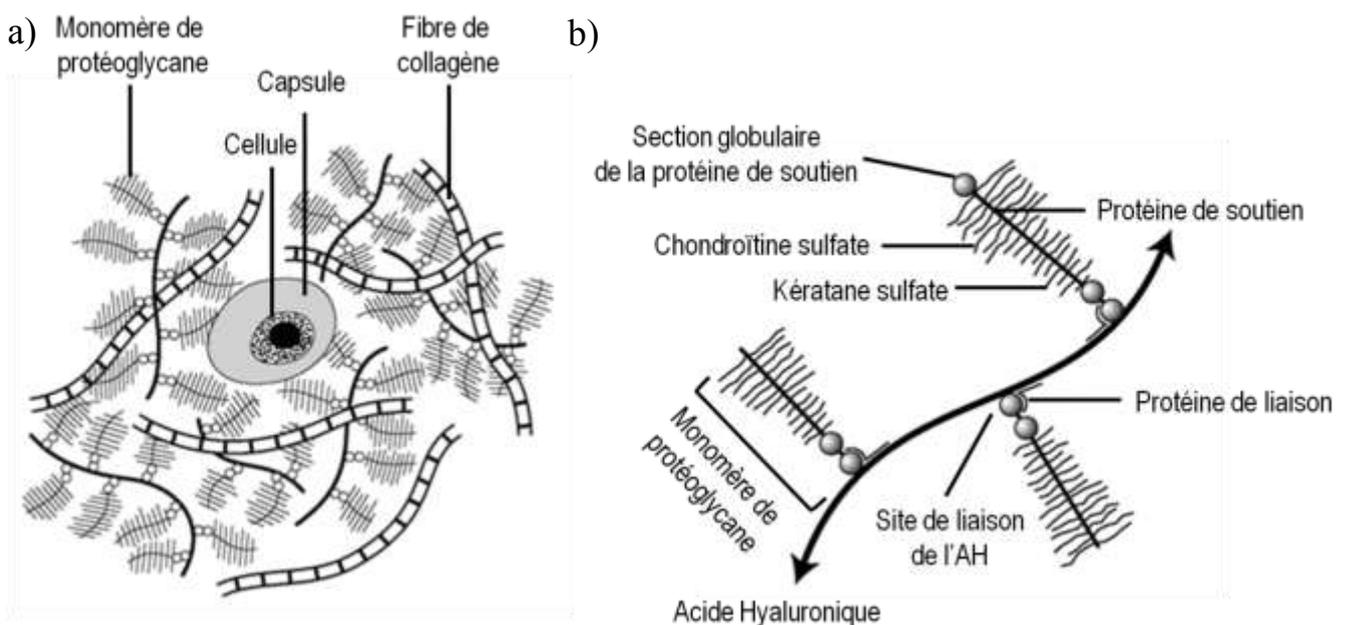


Figure I-2 : a) Schéma de la structure du cartilage montrant des fibres collagéniques entremêlées avec de nombreuses molécules de protéoglycanes. b) Schéma d'un agrégat de protéoglycanes (adapté de [Riihimäki & Viikari-Juntura, 2000]).

Dans l'arthrose, de nombreuses molécules biologiques provoquent la dégradation du cartilage, entravent les tentatives de réparation et perturbent l'homéostasie du cartilage. Les mécanismes sous-jacents conduisent au développement d'un cercle vicieux auto-entretenu. Ainsi, lorsque le cartilage se décompose, des changements se produisent dans l'os sous-jacent, qui s'épaissit avec la formation d'excroissances osseuses à partir de couches de cartilage calcifié et de la surface de l'os, pouvant à leur tour favoriser la dégradation du cartilage. Parallèlement, la cavité synoviale devient inflammée.

Les chondrocytes produisent alors des médiateurs associés avec l'inflammation, des cytokines, des chemokines et des enzymes protéolytiques qui peuvent encore dégrader le cartilage. Les contributeurs clés à ce processus catabolique sont les métalloprotéinases matricielle (MMPs), l'interleukine-1 β (IL-1 β), les facteurs de croissance et les radicaux libres. Le facteur de croissance IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) et les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) sont à l'inverse des facteurs stimulant la génération de cartilage et son remodelage.

Un déséquilibre entre processus anabolique et catabolique peut ainsi provoquer une dégradation sévère du cartilage. L'un des facteurs majeurs pouvant provoquer ce déséquilibre est la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β qui peut être exprimée par les chondrocytes et les synoviocytes. Intracellulairement, la forme non mature de IL-1 β est convertie par l'enzyme ICE (Interleukin-1 converting enzyme), ou caspase 1, dans la forme mature IL-1 β . L'interleukine active alors des protéases, telles que les MMPs, qui clivent les fibres de collagène (MMP, MMP8 et MMP-13) et les protéoglycanes (MMP3). Le phénomène peut être augmenté par la conversion de pro-MMPs en forme mature par l'action de MMP-3 (figure I-3).

L'interleukine IL-1 β et le facteur TNF α (tumeur-necrosis factor- α) induisent de plus la surproduction de cyclooxygénase COX2 et prostaglandine PGE₂, marqueurs de l'inflammation, dans l'articulation. Cette surexpression provoque *in fine*, à travers la phosphorylation de la kinase I κ B, l'augmentation de la production de MMPs et de COX (figure I-2). Le cercle vicieux est ainsi auto-entretenu et génère des dégradations sévères de la structure du cartilage. Bien que le point d'entrée de ce cercle n'ait pas été identifié, le rôle de l'interleukine IL-1 β semble prépondérant [Ea *et al.*, 2011].

A2 b) L'os

L'arthrose affecte l'os de diverses façons. Les zones se situant sous le cartilage affecté subissent un remodelage important, impliquant à la fois la formation et la résorption d'os, lors des premiers stades de la maladie. Les mécanismes régulant ces phénomènes sont encore mal compris dans le cas de l'arthrose. Le débat est encore ouvert sur l'ordre de la dégradation de l'articulation chez l'homme, entre la destruction du cartilage et le remodelage osseux. Des preuves ont cependant été apportées lors d'études chez l'animal, que la destruction du cartilage précède la modification de l'os [Felson & Neogi, 2004].

L'os subit plusieurs types de modification, impliquant la sclérose de l'os spongieux sub-articulaire et la formation d'ostéophytes¹, ou d'ostéochondrophytes. Il n'est pas encore établi si ces

¹ une excroissance osseuse entourant une articulation

formations accélèrent ou ralentissent la progression de l'arthrose dans l'ensemble de l'articulation. La vascularisation de ces structures, comparée au cartilage sain, est accompagnée du développement de fibres nerveuses qui pourraient constituer une source de douleur supplémentaire pour les patients.

A2 c) Liquide synovial et membrane synoviale

Le liquide synovial agit comme lubrifiant de l'articulation et comme source de nutriments pour cartilage et les ménisques peu vascularisés. Il est formé par un filtrat de plasma contenant une grande quantité de glycoprotéines et d'acide hyaluronique lui procurant sa haute viscosité. Un fluide synovial normal est clair, sans couleur, visqueux, d'une consistance proche du blanc d'œuf (synovium provenant du latin « blanc d'œuf »). Sa composition est détaillée dans le tableau I-2 et comparée à celle d'autres fluides biologiques.

Tableau I-2 : Composition du liquide synovial en comparaison d'autres fluides corporels humains, adapté de Yavorsky *et al.* [Yavorsky *et al.*, 2008]

Test	Fluide synovial	Plasma	Sueur	Salive	Liquide séminal
pH	7,4	7,35–7,45	4–6,8	6,4	7,19
Densité	1,008–1,015	1,0278	1,001–1,008	1,007	1,028
Electrolytes/mmol·L ⁻¹					
Potassium	4	3,5–5,0	4,3–14,2	21	31,3
Sodium	136,1	135–147	0–104	14	117
Calcium	0,5–2,4	2,2–2,6	0,1–3,0	1,5	6,2
Magnésium		0,7–1,3	0,01–2	0,3	5,8
Bicarbonate	19,3–30,6	22–35		2	8
Chlorure	107,1	95–105	34,3	17	42,8
Protéines - Total					
	1,72 g·dL ⁻¹	6–8 g·dL ⁻¹	7,7 mg·dL ⁻¹	386 ^b mg·dL ⁻¹	4,5 g·dL ⁻¹
Albumine	55–70%	50–65%			
Alpha-1-globuline	6–8%	3–5%			
Alpha-2-globuline	5–7%	7–13%			
Beta-globuline	8–10%	8–14%			
Gamma-globuline	10–14%	12–22%			
Acide hyaluronique	0,3–0,4 g·dL ⁻¹				
Métabolites/mg·dL ⁻¹					
Aminoacides			47,6	40	1,26
Glucose	70–110	70–110	3	11	224 ^c
Acide urique	2–8	2–8	26–122	20	72
Lipides, total				25-500	188

La composition du liquide synovial varie chez un patient arthritique : il change de couleur, de viscosité et comporte plus de cellules. Ainsi les inflammations de la membrane synoviale sont courantes dans les cas d'arthrose, même dans les stades précoces de la maladie. Les mastocytes

synoviaux sont particulièrement impliqués dans l'évolution des différents symptômes, leur nombre augmentant dans les cas d'arthrose. De même, le liquide synovial devient moins visqueux n'assurant plus entièrement son rôle mécanique (lubrifiant), accélérant la dégradation du cartilage.

La membrane synoviale est densément innervée par des fibres nerveuses de petit diamètre. Les facteurs IL-1 β et TNF α ont la capacité d'activer les nocicepteurs, un récepteur sensoriel de la douleur, les rendant ainsi plus sensibles aux stimuli ultérieurs. Les cytokines IL-1 β et TNF α ont ainsi été identifiées comme contribuant *in vivo* à des symptômes d'hyperalgie inflammatoire. De plus, les cytokines IL-1 β et TNF α favorisent la libération de la prostaglandine E₂ et d'histamine, par les chondrocytes et les mastocytes, qui peuvent à leur tour sensibiliser les nocicepteurs. Parallèlement, une hormone peptidique, la bradykinine, est générée dans la membrane synoviale et active aussi les nocicepteurs.

Tous ces mécanismes contribuent à l'inflammation locale de la membrane synoviale favorisant *in fine* la dégradation de l'articulation.

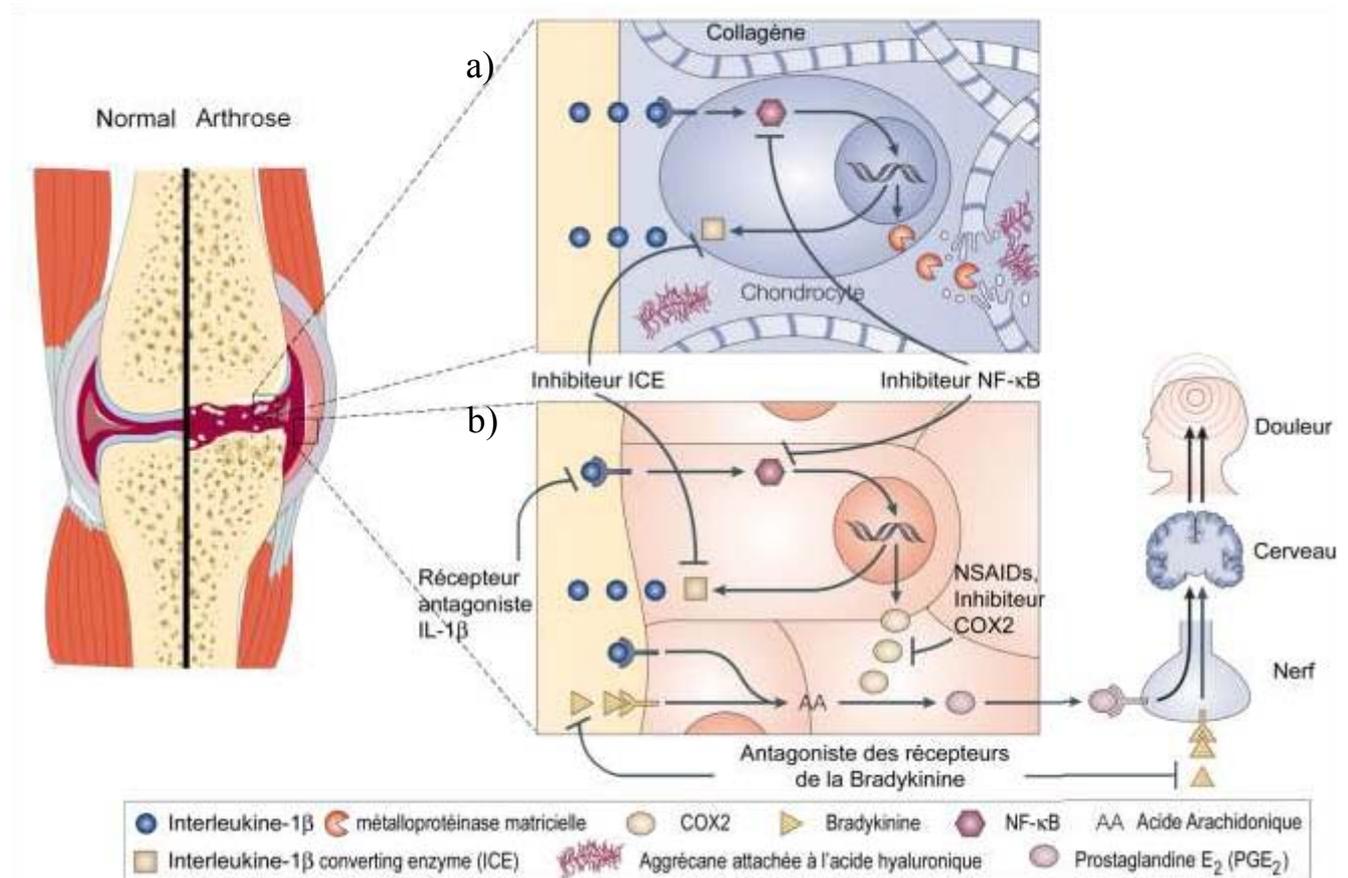


Figure I-3 : Mécanismes de dégradation de l'articulation : a) Dégradation du cartilage, l'interleukine IL-1 β provoque l'expression de métalloprotéinases matricielles qui dégrade la matrice collagène. b) Mécanisme de la douleur, plusieurs approches de traitement repose sur inhibition de IL-1 β ou NF- κ B, ou le blocage de leur récepteurs associés. Les traitements actuels ciblent le médiateur de la douleur, la prostaglandine E₂. COX2, cyclooxygénase 2.

Si les mécanismes contrôlant l'inflammation et la dégradation de l'articulation dans les cas

d'arthrose sont de mieux en mieux décrits depuis 10 ans, de nombreux points restent à éclaircir notamment lors des premiers stades de la maladie. Les traitements de l'arthrose actuels reposent ainsi principalement sur la réduction de ses symptômes, principalement la douleur, avec une efficacité modérée, sans traiter efficacement la cause de la maladie. Le développement de nouveaux traitements est principalement limité par la compréhension partielle des mécanismes à l'origine de l'arthrose. La figure I-4 présente les différentes stratégies de prise en charge/traitement de la maladie en fonction de son stade de développement ; l'ultime étape, souvent inévitable, étant la pose d'une prothèse articulaire.

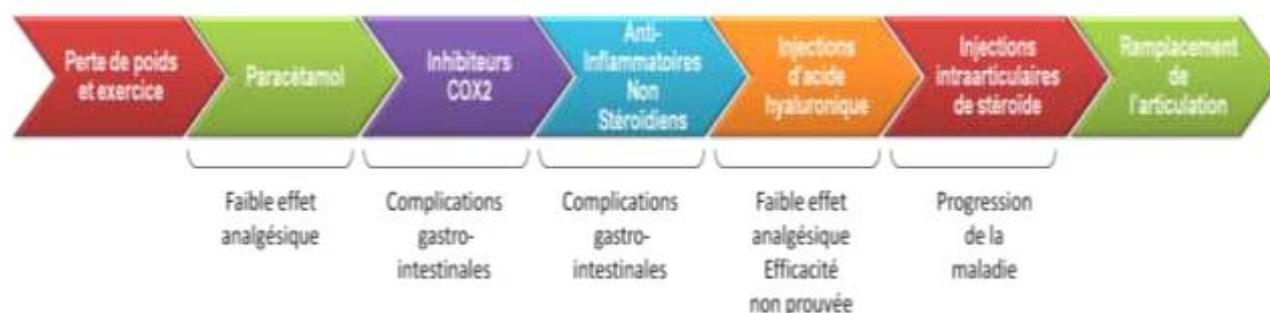


Figure I-4 : Stratégies de traitement de l'arthrose à différents stades de la maladie [Zhang *et al.*, 2011]

Les calcifications du cartilage et la présence des cristaux calciques dans l'articulation présentent une piste de recherche pouvant expliquer les causes de l'arthrose et l'un des mécanismes contribuant au cercle vicieux favorisant l'aggravation de la maladie.

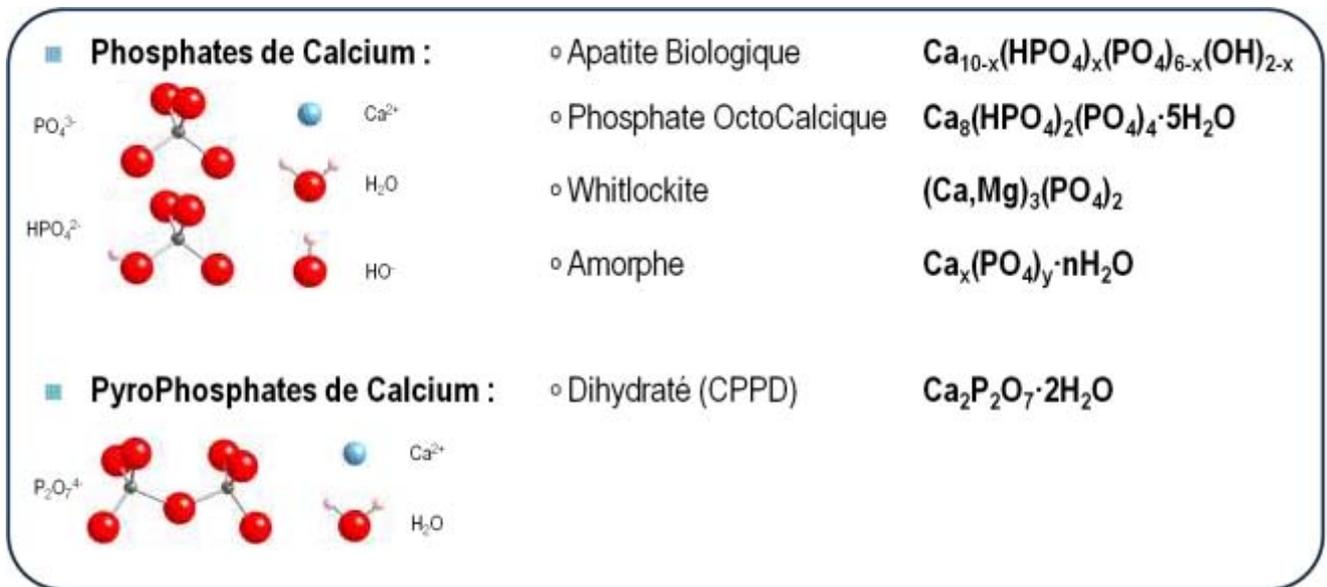
A3. Micro-calcifications pathologiques

Bien que décrit depuis plus de 50 ans, la présence de microcalcifications dans l'articulation et leur impact sur l'évolution de la maladie restent à préciser et les connaissances sur ce point nécessitent d'être approfondies tant sur le plan médical que physico-chimique [McCarty *et al.*, 1966].

A3 a) Phosphates de calcium : ortho- et pyrophosphates

Deux principaux types de microcristaux ont été identifiés dans les liquides articulaires et le cartilage arthrosique : les orthophosphates de calcium (CaP) incluant les cristaux de phosphate octocalcique, d'apatite carbonatée et de phosphate tricalcique) et les pyrophosphates de calcium (CPP) [MacMullan *et al.*, 2011]. Deux formes de CPP ont été identifiées *in vivo* : les pyrophosphates de calcium dihydratés monoclinique (m-CPPD) et triclinique (t-CPPD) [Kohn *et al.*, 1962]. Chacune des formes est présente dans les articulations avec des fréquences différentes : les orthophosphates de calcium ayant été identifiés dans plus de 90 % des cas, contre 20% pour les pyrophosphates de calcium, les deux types de calcification pouvant cohabiter [Fuerst *et al.*, 2009]. Les différentes formes

de phosphate et pyrophosphate de calcium identifiées *in vivo* sont répertoriées dans la planche I -5. Si le potentiel inflammatoire de ces différents cristaux a été évalué *in vitro*, leur rôle dans la destruction du cartilage et le développement et l'aggravation de la maladie est encore mal compris et discuté [Roch-Arveiller *et al.*, 1990; Swan *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2009].



Figurel -5 : Les différentes formes de phosphate et pyrophosphate de calcium identifiées dans les articulations de patients arthritiques avec les schémas des molécules et ions constituant ces différentes phases.

Ces différents microcristaux calciques induisent *in vitro* la production de cytokines inflammatoires, dont l'interleukine IL-1 β , pouvant initier les mécanismes de dégradation articulaire. Leur effet sur les cellules du cartilage et du liquide synovial, chondrocytes et synoviocytes, a cependant été peu étudié.

Si les propriétés physico-chimiques des différents orthophosphates de calcium présents *in vivo* ont été largement étudiés, les pyrophosphates de calcium restent peu décrits dans la littérature et sont relativement mal connus.

A3 b) Les pyrophosphates de calcium dihydratés

(1) Arthrose et pyrophosphate de calcium dihydraté

Un seul type de pyrophosphate de calcium a été identifié *in vivo* de puis leurs premières descriptions *in vivo* en 1962 par McCarty, Kohn *et al.* : Les pyrophosphates de calcium dihydratés (CPPD) cristallisés de formule $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Kohn *et al.*, 1962; McCarty *et al.*, 1962; Liu *et al.*, 2009]. Aucune preuve de la présence d'une phase amorphe de pyrophosphate de calcium n'a été mise en évidence [Pritzker, 1998]. Cette spécificité est à opposer à la grande variété de formes d'orthophosphate de calcium présentes dans le corps humain, sous forme de cristaux, nanocristaux.

Deux formes de CPPD ont été identifiées *in vivo* : les pyrophosphates de calcium dihydratés monoclinique (m-CPPD) et triclinique (t-CPPD), possédant chacun des propriétés inflammatoires différentes [Roch-Arveiller *et al.*, 1990; Swan *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2009]. Ils sont reportés dans de nombreuses articulations, principalement le genou, le poignet, les épaules et les chevilles avec une grande diversité de taille, de 0,06 à 0,3 µm dans l'articulation temporo-mandibulaire jusqu'à 1 à 20 µm dans le genou [Kohn *et al.*, 1962; Dijkgraaf *et al.*, 1995]. Ces propriétés inflammatoires impliquent la libération d'interleukine-1β par les macrophages et de marqueurs spécifiques de l'inflammation dans le milieu de culture. L'étude de Liu *et al.* présente par exemple l'évolution de différents marqueurs d'inflammation en présence de pyrophosphates de calcium hydratés t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT β et d'orthophosphate de calcium (DCPD, ou brushite, CaHPO₄·2H₂O) (figure I-6). Cette étude indique que les différentes phases de pyrophosphate de calcium provoquent une réaction inflammatoire, mise en évidence par la production de nitrite (NO), aboutissant à une potentielle détérioration de la matrice collagène par les MMPs et une activation des nocicepteurs par la prostaglandine E2 (voir figure I-3 a et b).

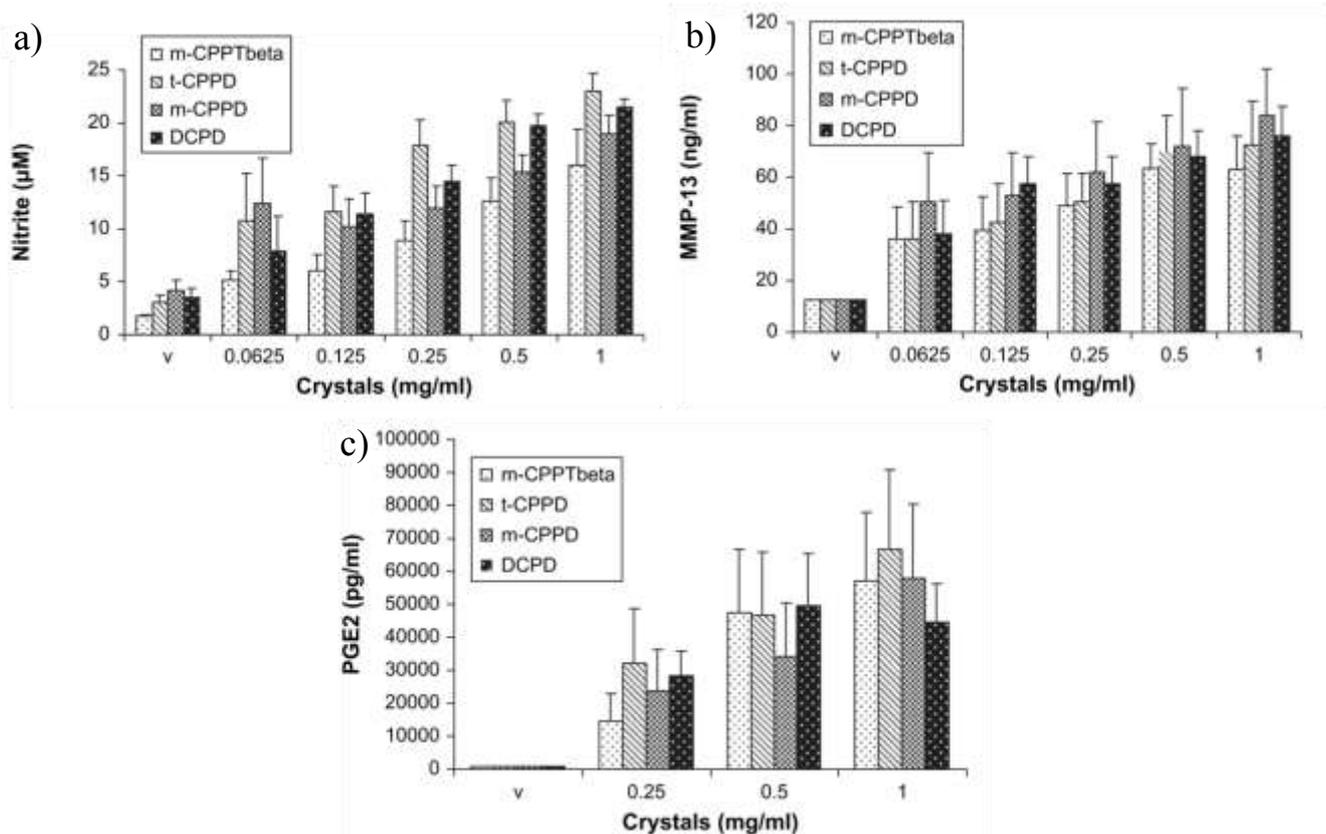


Figure I-6 : Concentration de nitrite (NO) (n=5) et de MMP-13 (n=3) produits par les chondrocytes et de PEG₂ (n=5) par des synoviocytes après 24h en présence de différentes concentrations de cristaux de m-CPPT β, t-CPPD, m-CPPD et brushite.[Liu *et al.*, 2009]

Le manque de caractérisation physico-chimique complète sur ces phases avant, durant et après les expériences biologiques ne permet cependant pas de relier directement le potentiel inflammatoire à

la surface de cristal considéré, à la morphologie des cristaux ou à leurs évolutions. Malgré cela, la présence de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté peut être considérée comme un des éléments déclencheurs de l'arthrose ou un élément du cercle vicieux entretenant celle-ci.

(2) *Les dépôts de pyrophosphate de calcium dihydraté in vivo*

Les cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté sont aussi responsables d'une autre forme d'arthrite, différente de l'arthrose, particulièrement répandue, touchant jusqu'à 35% de la population de plus de 80 ans : la maladie à dépôt de pyrophosphate de calcium ou chondrocalcinose. Ce terme est cependant réservé aux calcifications du cartilage en général, fréquemment constituées de cristaux de CPPD.

Cette maladie, asymptomatique dans 25% des cas, peut se manifester sous forme chronique ou de crise, anciennement qualifiée de pseudo-goutte. Cette maladie peut être associée à l'arthrose avec présence de cristaux de pyrophosphate de calcium dans 50% des cas.

(3) *Mécanisme supposé d'interaction avec les cellules*

Les propriétés inflammatoires des pyrophosphates de calcium sont cependant bien connues ; leur potentiel inflammatoire s'avérant très élevé, provoquant *in fine* la génération de grandes quantités de cytokines inflammatoires. Le processus d'interaction entre les cristaux et les chondrocytes aboutissant à cette libération est cependant encore inconnu. Une interaction entre la surface des cristaux et les membranes des cellules pourrait être à l'origine des différents mécanismes aboutissant à la libération d'interleukine IL-1 β par les macrophages.

Un mécanisme de rupture cellulaire basé sur l'interaction entre la membrane cellulaire, composée de phospholipides, et la surface chargée du cristal a été proposé par Mandel [Mandel, 1976; Wierzbicki *et al.*, 2003]. Une interaction privilégiée des molécules membranaires avec la surface des cristaux de pyrophosphate de calcium pourrait en effet favoriser leur adsorption et provoquer la rupture de la membrane cellulaire. Ce modèle n'a cependant pas été validé expérimentalement et repose sur des calculs *ab initio* [Wierzbicki *et al.*, 2003].

Même si le manque de données sur les différentes phases de pyrophosphates de calcium ne permet pas une évaluation complète de leurs propriétés inflammatoires, celles-ci semblent supérieures à celles des orthophosphates de calcium [Liu *et al.*, 2009].

B. Les pyrophosphates de calcium d'intérêt biologiques

Bien que le lien entre cristaux de pyrophosphate de calcium et arthrose ait été démontré d'un point de vue clinique, peu de données physico-chimiques sont disponibles sur les différentes phases de CPP.

B1. Pyrophosphate : $P_2O_7^{4-}$

Les molécules de pyrophosphate sont issues de la condensation de deux molécules d'orthophosphate, liées entre elles par un atome d'oxygène. Elles constituent ainsi la plus simple forme de phosphate condensé, famille comprenant les polyphosphates linéaires, les cyclophosphates et les phosphates réticulés [Roiland *et al.*, 2011].

B1 a) Méthodes de synthèse in vitro

Les pyrophosphates ont été identifiés pour la première fois en 1827 par Thomas Clark et William Haidinger dans une série de quatre articles, établissant en même temps le lien entre pyrophosphate et pyroarsenate de sodium [Clark, 1827a; b; c; Haidinger, 1827]. Cette première synthèse reportée comme ayant été effectuée à haute température, le phosphate de soude ayant été « chauffé au rouge » dans un bain de plomb fondu, introduit pour la première fois le terme de pyrophosphate pour caractériser cette famille de composés.

Les pyrophosphates ont depuis majoritairement été synthétisés à partir d'acide phosphorique fumant en solution, à des températures supérieures à 210°C, ou par condensation à l'état solide d'hydrogénophosphate à des températures supérieures à 320°C [Brown *et al.*, 1963; Webb, 1966; Calvo & Au, 1969; de Oliveira *et al.*, 2005]. Cette température correspond notamment à la température de fusion du plomb mentionnée par Clark. La réaction de condensation à haute température d'acide phosphorique ou de composés d'hydrogénophosphate libère une molécule d'eau suivant la réaction :



La réaction est endothermique, et la réaction inverse d'hydrolyse du pyrophosphate peut avoir lieu à basse température en milieu acide ou à haute température en phase solide [Slater *et al.*, 2011; Stockbridge & Wolfenden, 2011; Hong *et al.*, 2012].

B1 b) Synthèse *in vivo* et régulation extracellulaire

Le pyrophosphate extracellulaire est produit par réaction de composés polyphosphatés, tels que l'adénosine triphosphate (ATP), par l'action d'enzyme et notamment de la nucléoside triphosphate pyrophosphohydrolase (NTP-PPase) et des enzymes de la famille des ectonucléotide pyrophosphatase-phosphodiesterase 1 (ENPP1) [Mackenzie *et al.*, 2012]. Ces enzymes, présentes dans le cartilage articulaire, dégradent l'ATP et les autres nucléosides triphosphates régulant ainsi la concentration de pyrophosphates extracellulaires (figure I-7). D'autres protéines transmembranaires forment des canaux à pyrophosphates, telle que la protéine ANKH qui joue un rôle essentiel dans l'acheminement des pyrophosphates produits dans la cellule, lors de la synthèse d'un brin de polynucléide (ADN ou ARN) à partir de nucléotides triphosphate par exemple. Le ratio entre orthophosphate et pyrophosphate extracellulaire est de plus maintenu par l'action de la phosphatase alcaline (TNAP) catalysant l'hydrolyse des pyrophosphates (figure I-7). Le pyrophosphate intracellulaire peut finalement être libéré en même temps qu'une macromolécule matricielle, type collagène.

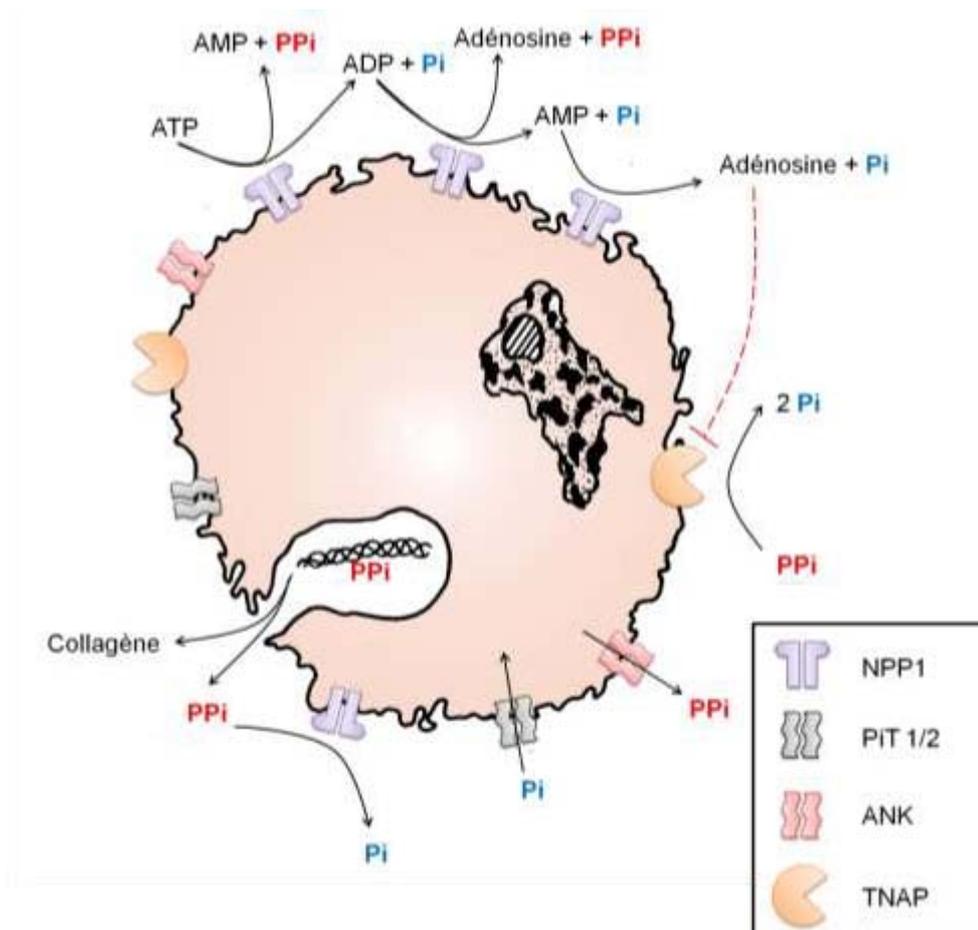


Figure I-7 : Schéma des mécanismes de production de pyrophosphate (PPi) et d'orthophosphate (Pi) extracellulaires montrant le rôle des pyrophosphatase-phosphodiesterase 1 (NPP1) et des phosphatases alcalines (TNAP) dans l'hydrolyse de l'ATP et la production de phosphate inorganique. Les protéines transmembranaires ANK et P_iT 1 et 2 régulent les concentrations extra et intracellulaires. Adapté de [Ryan & McCarty, 1995; Mackenzie *et al.*, 2012]

Les processus mis en jeu sont régulés à la fois par la concentration de pyrophosphate, d'orthophosphate et d'adénosine [Ryan & McCarty, 1995]. Finalement, la précipitation de composé d'orthophosphate ou de pyrophosphate, possédant une solubilité très basse, dans le milieu intercellulaire en présence de la matrice collagène permet de contrôler les quantités d'orthophosphate et de pyrophosphate [Paschalakis *et al.*, 1993, 2002]. Ces précipitations aboutissent à la formation de composés de phosphate et de pyrophosphate de calcium présentés précédemment. De même, dans ces processus, le pyrophosphate joue un rôle majeur dans l'inhibition de la cristallisation des orthophosphates de calcium dans l'organisme, une déficience de pyrophosphate pouvant aboutir à des calcifications pathologiques de tissus [Addison *et al.*, 2007; Villa-Bellosta *et al.*, 2011].

Tous ces mécanismes visent à réguler la concentration de pyrophosphate dans le milieu intercellulaire, le pyrophosphate ayant un rôle majeur dans l'inhibition des orthophosphates de calcium dans l'organisme.

B2. Pyrophosphates de calcium hydratés (CPP : $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)

Plusieurs phases de pyrophosphate se forment dans le milieu extracellulaire et sont impliquées dans les processus liés à l'arthrose présentés précédemment. Si les sources de pyrophosphates et de calcium sont identifiées dans ce milieu, les conditions de précipitation, de cristallisation et de stabilité des phases de pyrophosphate de calcium d'intérêt biologique restent peu décrites. En raison des faibles quantités disponibles *in vivo*, il est intéressant de pouvoir mener également des études à partir de composés synthétisés *in vitro*.

B2 a) Les premières méthodes de synthèse

Les composés métalliques de pyrophosphates ont été décrits dès les années 1820-1840, après la découverte des premiers pyrophosphates et de leur stabilité [Clark, 1827c; Bassett *et al.*, 1936]. Leurs propriétés, notamment leur faible solubilité et leur stabilité ont été très vite identifiées. Ainsi, les composés amorphes de pyrophosphate synthétisés en solution à partir du pyrophosphate de sodium ont été caractérisés comme stables pour une durée « indéterminée » dès 1847 [Bassett *et al.*, 1936]. Les synthèses effectuées par la suite sont cependant principalement réalisées à l'état solide, à haute température, et conduisent à des composés anhydres. Ainsi, très peu d'études ont porté sur la précipitation de pyrophosphate de calcium jusque dans les années 1960 [Pritzker, 1998].

A notre connaissance, les premières synthèses de composés de pyrophosphate de calcium hydraté reportées dans les années 1957 et 1963, ont été entreprises par Brown *et al.* dans le but de préparer des engrais plus denses et stables durant le transport que les engrais d'orthophosphate de

calcium [Brown *et al.*, 1963; McCarty, 1983]. Néanmoins, les faibles solubilités des composés formés ont cependant réduit les applications potentielles de ces composés. Plus de 25 composés contenant du pyrophosphate et du calcium ont cependant été mis en évidence, l'ion calcium se trouvant associé le plus souvent aux cations NH_4^+ et K^+ [Brown *et al.*, 1963]. Quatre phases cristallisées de pyrophosphate de calcium hydraté, sans potassium ni ammonium, ont été décrits : m-CPPD, t-CPPD, et un dimorphe de pyrophosphate de calcium tétra hydraté (CPPT: $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) désigné plus tardivement m-CPPT α et m-CPPT β [Brown *et al.*, 1963; Davis *et al.*, 1985; Balić-Žunić *et al.*, 2000].

Les phases amorphes a-CPP (CPPT: $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et cristallisée m-CPPT β ont de plus été identifiées comme précurseurs *in vitro* de phases dihydratées observées *in vivo* [McCarty *et al.*, 1966].

La figure I-7 donne une représentation schématique des évolutions et relations entre les différentes phases de pyrophosphate de calcium hydraté *in vitro*.

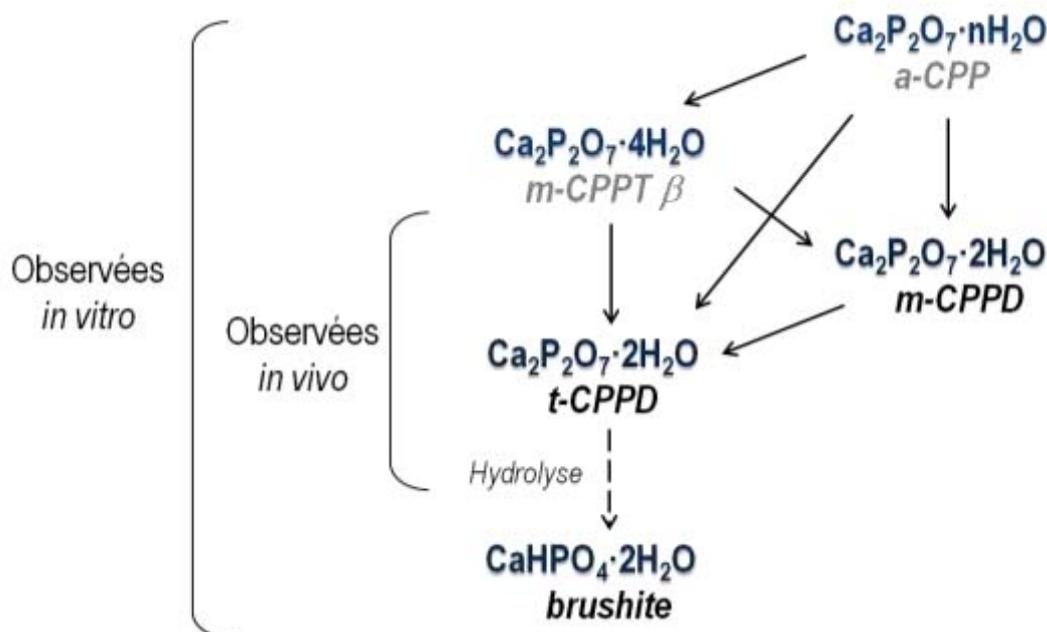


Figure I-8 : Evolution *in vitro* des différentes phases de pyrophosphate de calcium hydraté [McCarty *et al.*, 1966]

B2 b) Les pyrophosphates de calcium d'intérêt biologique

(1) Synthèses des CPP

L'identification de cristaux de pyrophosphate de calcium, correspondant aux phases t-CPPD et m-CPPD, dans les articulations de patients arthritiques par les groupes de McCarty et Kohn quasiment simultanément par rapport aux travaux de Brown *et al.* ont renforcé l'intérêt pour ces composés [Kohn I-16 |

et al., 1962; McCarty *et al.*, 1962; Brown *et al.*, 1963; McCarty, 1983].

Deux catégories de méthodes de synthèse ont alors été mises au point afin d'étudier ces calcifications. Le premier protocole vise l'étude de la formation des pyrophosphates de calcium d'intérêt biologique. Il consiste en une réaction de double décomposition entre deux solutions, l'une constituée de sels solubles de pyrophosphate et l'autre de sels solubles de calcium. Ces solutions sont mises en contact, de diverses manières notamment dans la synthèse de cristaux en gel, afin de se rapprocher des conditions observées *in vivo* [Mandel *et al.*, 1984; Pritzker, 1998]. L'étude des différents additifs sur la cristallisation a ainsi pu être réalisée, bien que les rendements obtenus soient faibles et les résultats non reproductibles [Mandel *et al.*, 1984; Christoffersen & Christoffersen, 2003]. Le deuxième protocole, mis en place dans l'optique d'obtenir un meilleur rendement de la réaction, est basé sur l'utilisation d'un intermédiaire de pyrophosphate de calcium. La dissolution de cet intermédiaire, généralement le dihydrogénopyrophosphate de calcium $\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$, puis une recristallisation sous certaines conditions permet d'obtenir la phase de CPP souhaitée.

Cependant ces méthodes présentent des inconvénients décrits par Groves *et al.* : elles conduisent finalement à de faibles rendements totaux, les expériences durent entre 2 heures et une semaine pour obtenir des masses de l'ordre du gramme, et impliquent généralement un intermédiaire de réaction synthétisé, une phase amorphe de pyrophosphate de calcium hydraté α -CPP ou $\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Ce dernier est obtenu par condensation d'acide orthophosphorique concentré à 210°C sous agitation vigoureuse pendant plusieurs heures ce qui nécessite de nombreuses précautions et un équipement adapté pour réaliser cette synthèse [Groves *et al.*, 2007]. Des améliorations successives et des méthodes alternatives ont été proposées et ont permis de pallier à un ou plusieurs de ces inconvénients pour la synthèse de t-CPPD, m-CPPT β et α -CPP. Aucune amélioration n'a cependant été publiée concernant la synthèse de la phase m-CPPD, l'une des deux phases pathologiques. Le tableau I-3 récapitule les conditions de préparation des différentes phases de CPP hydraté qui ont été publiées. Il est à noter que la reproductibilité de ces méthodes pour l'obtention d'une phase pure définie est assez faible, certains protocoles publiés, basés sur Mandel *et al.*, utilisent des ions magnésium afin de stabiliser le m-CPPD [Mandel *et al.*, 1984; Christoffersen & Christoffersen, 2003].

L'étude des mécanismes de formation des phases de CPP *in vitro* et leur caractérisation pourraient améliorer la compréhension des phénomènes *in vivo*.

Tableau I-3 : Conditions standards de préparation des différentes formes de CPP. Adapté de [Brown *et al.*, 1963; Mandel *et al.*, 1988; Pritzker, 1998].

	<i>Réactif</i>	<i>Temp.</i>	<i>pH</i>	<i>Durée</i>	<i>Additifs</i>	<i>Inconvénients</i>
t-CPPD	CaH ₂ P ₂ O ₇	45°C	neutre	7 jours		Lent, réactif instable
m-CPPD	a-CPP	45°C	neutre	14 jours		Lent, impuretés, faible quantité
m-CPPD	CaH ₂ P ₂ O ₇	80°C	acide	2 jours	MgCl ₂	Impuretés, réactif instable, faible quantité
m-CPPT β	CaH ₂ P ₂ O ₇	20°C	pH 3 à 5	36 heures		Réactif instable

(2) Caractérisations des CPP

Diverses caractérisations ont été réalisées sur les composés de pyrophosphate de calcium obtenus selon les méthodes reportées dans le paragraphe précédent ; leur qualité varie avec la facilité d'obtention des phases concernées. Ainsi, si les structures des phases t-CPPD et m-CPPT β ont été publiées, nous ne disposons pour la phase m-CPPD que de paramètres de maille qui ont été déterminés par Mandel *et al.* [Mandel, 1975; Mandel *et al.*, 1988; Balić-Žunić *et al.*, 2000]. De plus, les données de diffraction des rayons X disponibles jusqu'à récemment étaient partielles, ne permettant pas l'évaluation de la pureté des composés par comparaison avec des étalons expérimentaux [Brown *et al.*, 1963; Mandel *et al.*, 1988]. Les diagrammes publiés par Groves *et al.* pour la phase t-CPPD et par Liu *et al.* pour les phases t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT β ont depuis permis de constituer des mesures de référence [Groves *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009]. Le diagramme de la phase m-CPPD publié semble cependant indiquer que l'échantillon utilisé n'était pas entièrement pur et contenait des cristaux de t-CPPD. De même, le diagramme de la phase t-CPPD présenté dans ce même article, par comparaison avec celui reporté par Groves *et al.* présente des réflexions attribuables à la phase m-CPPD. Malgré ces impuretés, ils représentent les meilleurs échantillons de référence disponibles dans la littérature. Ces observations soulignent la difficulté d'obtenir des échantillons purs.

L'identification des différentes phases par spectroscopies infrarouge et Raman peut s'appuyer sur de nombreux spectres reportés dans la littérature, réalisés principalement sur des échantillons biologiques [Kohn *et al.*, 1962; Rosenthal *et al.*, 2008; Fuerst *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2011]. Toutefois, ces techniques ne permettent pas une identification précise de la phase caractérisée, l'échantillon biologique pouvant contenir une ou plusieurs phases. L'étude des spectres Infrarouge et

Raman de la phase t-CPPD a cependant été réalisée sur un échantillon synthétique par Cornilsen et elle a permis d'identifier cette phase dans différents échantillons [Cornilsen, 1984]. Les données pour les phases m-CPPT β et m-CPPD ne sont pas disponibles dans la littérature à notre connaissance.

De nombreuses caractérisations reposent sur la morphologie des cristaux, observés en microscopie optique ou électronique [Cheng & Pritzker, 1980; Mandel *et al.*, 1988; Yan *et al.*, 1991; Blair *et al.*, 1995; Christoffersen *et al.*, 1999, 2000, 2001; Ivorra *et al.*, 1999; Eliseo & Vega, 2005; Fuerst *et al.*, 2010; Omura *et al.*, 2010]. Ces caractérisations montrent surtout la très grande diversité de formes des cristaux de pyrophosphate de calcium, généralement aciculaires pour les phases t-CPPD et m-CPPD, et en plaquettes pour la phase m-CPPT β .

(3) *Autres applications biologiques des pyrophosphates de calcium*

Notons que les pyrophosphates de calcium sont aussi présents dans les bioverres de phosphates de calcium [Massiot *et al.*, 2008; Roiland *et al.*, 2011], lorsqu'ils sont synthétisés par fusion et condensation des orthophosphates à haute température, et ont été récemment utilisés dans des ciments, montrant d'intéressantes propriétés ostéoconductrices [Grover *et al.*, 2013].

C. Conclusions

Malgré leur importance dans les mécanismes liés à l'arthrose, les micro-calcifications à base de pyrophosphate de calcium dihydraté ont été moins étudiées que celles à base d'orthophosphate de calcium. Plus de 50 ans après leur première identification *in vivo*, la littérature et les données publiées sur les pyrophosphates de calcium hydratés restent très limitées. Les différents protocoles de synthèse proposés possèdent de nombreux inconvénients qui n'ont pas permis l'étude exhaustive des propriétés physico-chimiques des CPP ; il apparaît donc essentiel de travailler à la mise au point d'une méthode de préparation reproductible permettant d'obtenir des phases de CPP pures afin de disposer d'échantillons de référence pour les futures analyses physico-chimiques. Par ailleurs, une meilleure caractérisation de chacune des phases permettrait de mieux comprendre le lien entre cristaux de pyrophosphate de calcium et leur potentiel phlogogène sur les articulations et pourrait à court ou moyen terme améliorer le diagnostic des différentes maladies en lien avec les CPP.

C'est sur ces aspects de synthèse et de caractérisations physico-chimiques et structurales fines de ces phases de pyrophosphate de calcium hydraté d'intérêt biologique que nous avons mené les travaux de recherche qui sont détaillés dans les chapitres suivants.

Chapitre II

Synthèse et caractérisation de phases de
pyrophosphate de calcium hydraté
d'intérêt biologique

Généralement, les deux paramètres les plus importants dans l'étude de la précipitation de nombreux sels en solution sont la température et le pH. Dans ce travail, nous nous sommes attachés à étudier systématiquement l'influence de ces paramètres, influence qui n'a pas été décrite et étudiée de façon exhaustive dans les précédents travaux traitant de la synthèse des CPP. Le but de cette étude est la mise au point d'une méthode de synthèse directe et rapide de phases pures de CPP d'intérêts biologiques, sans intermédiaire de synthèse, de manière reproductible et en quantité de l'ordre du gramme, notamment pour les phases m-CPPD et t-CPPD. Les conditions de pH et de température seront explorées à concentration, agitation et débit d'addition des réactifs constants. L'influence de la concentration sera aussi étudiée pour une condition de synthèse particulière, à pH et température constants notamment.

Chaque produit de réaction sera analysé par différentes analyses phases notamment par diffraction des rayons X, spectroscopies vibrationnelles, analyses thermogravimétriques et analyses chimiques.

A. Synthèse de pyrophosphates de calcium hydratés

A1. Etat de l'art

De nombreuses synthèses de composés hydratés de pyrophosphate, de formule générale $M_2P_2O_7 \cdot nH_2O$ où M est un ion métallique bivalent, ont été reportées par condensation des ions hydrogénophosphates HPO_4^{2-} [Oka & Kawahara, 1982; Effenberger & Pertlik, 1993; Giesber III *et al.*, 2000; Kongshaug *et al.*, 2000] ou par double décomposition [Brown *et al.*, 1963; Mandel *et al.*, 1988; Christoffersen *et al.*, 2001; Groves *et al.*, 2007; Slater *et al.*, 2011]. Dans ce dernier cas, la réaction de double décomposition est utilisée pour former un intermédiaire de réaction, souvent une phase amorphe [Brown *et al.*, 1963; Groves *et al.*, 2007; Slater *et al.*, 2011]. Le produit de réaction est alors mûri pendant plusieurs heures afin d'obtenir la phase cristalline désirée.

La phase amorphe de CPP a été identifiée comme particulièrement stable et peut se former à plus haute température que d'autres sels de calcium d'intérêt biologique tels que les amorphes d'orthophosphate de calcium et de carbonate de calcium. Contrairement à ces phases amorphes qui cristallisent rapidement à température ambiante, la phase a-CPP ne montre aucun signe de cristallisation lorsqu'elle est stockée pendant de longue période en solution à température ambiante [Baer, 1847; Bassett *et al.*, 1936; Slater *et al.*, 2011]. Cette stabilité pourrait être due à la « flexibilité » ainsi que probablement à la taille de l'ion $P_2O_7^{4-}$, comparativement aux ions CO_3^{2-} et PO_4^{3-} , qui pourrait inhiber la cristallisation de a-CPP [Slater *et al.*, 2011].

Une évolution de la phase amorphe évoquée plus haut vers les phases cristallisées d'intérêt biologique, t-CPPD et m-CPPD notamment, est cependant possible à pH acide, inférieur à pH 7, avec des temps de cristallisation variant de 1 jour à 1 semaine [Brown *et al.*, 1963; Mandel *et al.*, 1988; Groves *et al.*, 2007]. Ainsi plusieurs méthodes de synthèse publiées s'appuient sur ces évolutions, ou celles similaires du dihydrogénopyrophosphate de calcium ($\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$), afin d'obtenir les phases tétrahydratées m-CPPT α et m-CPPT β , et les phases dihydratées m-CPPD et t-CPPD en fonction des conditions d'évolution appliquées : pH, température, agitation, temps de synthèse. Le rendement des synthèses et la pureté des produits obtenus, particulièrement pour la phase m-CPPD, s'avèrent non reproductibles, variant sur de larges gammes [Mandel *et al.*, 1988; Christoffersen & Christoffersen, 2003].

Ce principe est aussi utilisé pour la formation de plusieurs pyrophosphates de manganèse $\text{Mn}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ [Schneider & Collin, 1973], d'une phase amorphe de pyrophosphate de cobalt $\text{Co}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ utilisé comme intermédiaire pour la synthèse de composés cristallins tels que $\text{Co}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [Capitelli *et al.*, 2003] et de pyrophosphate de calcium (CPP), qui après formation d'une phase amorphe a-CPP, cristallise en deux dimorphes de CPPD, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (t-CPPD et m-CPPD) et deux dimorphes de CPPT, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (m-CPPT α et m-CPPT β) suivant les conditions opératoires appliquées [Brown *et al.*, 1963; Christoffersen *et al.*, 2000; Groves *et al.*, 2007; Slater *et al.*, 2011]. Ces procédés nécessitent une connaissance précise des conditions opératoires utilisées pour chacune des phases et peuvent conduire à des mélanges de phases entre espèces stables et métastables proches.

Nous nous baserons sur ces exemples, et notamment leur conditions de synthèse, pour réaliser notre étude sur la formation des CPP en ne modifiant, initialement, que la température et le pH. Cette étude ne pourra être effectuée en tenant compte des sursaturations, les valeurs de la littérature des constantes de solubilité et les mesures de concentrations, notamment des ions pyrophosphates, étant sujet à caution. Le but étant d'obtenir au moins les deux phases dihydratées m-CPPD et t-CPPD présentes dans les articulations de patients arthritiques par une méthode de synthèse directe et rapide en utilisant la double décomposition, mais à débit d'ajout de réactif contrôlé afin de favoriser la formation de phase cristallisée.

A2. Matériels et méthodes

Les pyrophosphates de calcium hydratés ont été synthétisés par double décomposition de solutions de pyrophosphate de potassium et de nitrate de calcium ajoutées sous agitation dans une solution tamponnée en milieu acide à température contrôlée. L'influence du pH et de la température a été étudiée en variant le pH de la solution tampon dans une gamme comprise entre pH 3,6 et pH 5,8 et

la température entre 25 °C et 90°C à concentration donnée. Les échantillons ont été analysés par différentes techniques complémentaires afin d'être comparés aux données publiées dans la littérature [Brown *et al.*, 1963; Davis *et al.*, 1985; Mandel *et al.*, 1988; Balić-Žunić *et al.*, 2000; Slater *et al.*, 2011].

A2 a) Protocole de synthèse de pyrophosphates de calcium hydratés

Nous avons dans un premier temps préparé le précurseur utilisé pour préparer la solution de pyrophosphate. Le pyrophosphate de potassium anhydre ($K_4P_2O_7$) a été obtenu par condensation de 100 g d'hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4) à 400°C pendant 3 heures. Celui-ci est préféré au pyrophosphate de sodium anhydre pour sa plus grande solubilité et la plus large gamme de concentration accessible. Le pyrophosphate de potassium anhydre ainsi préparé a été analysé par DRX et spectroscopies FTIR et Raman. Aucune trace d'hydrogénophosphate de potassium n'a été détectée et l'analyse vibrationnelle a confirmé la présence de 5 bandes correspondant aux modes caractéristiques des ions $P_2O_7^{4-}$ à 950 et 750 cm^{-1} .

La solution tampon a été préparée par addition de 12 mL d'acide acétique dans 400 mL d'eau. Un volume d'ammoniaque est ajouté afin d'ajuster le pH à la valeur souhaitée.

Les solutions de réactifs ont été préparées séparément en ajoutant respectivement $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (7,16 g, i.e. $3,03 \cdot 10^{-2}$ mol) et $K_4P_2O_7$ (5,00 g, i.e. $1,51 \cdot 10^{-2}$ mol) à 200 mL d'eau. Elles sont ensuite ajoutées simultanément dans la solution tampon agitée à l'aide d'un barreau aimanté (400 tr/min) grâce à une pompe péristaltique à débit constant, 4,5 $mL \cdot min^{-1}$.

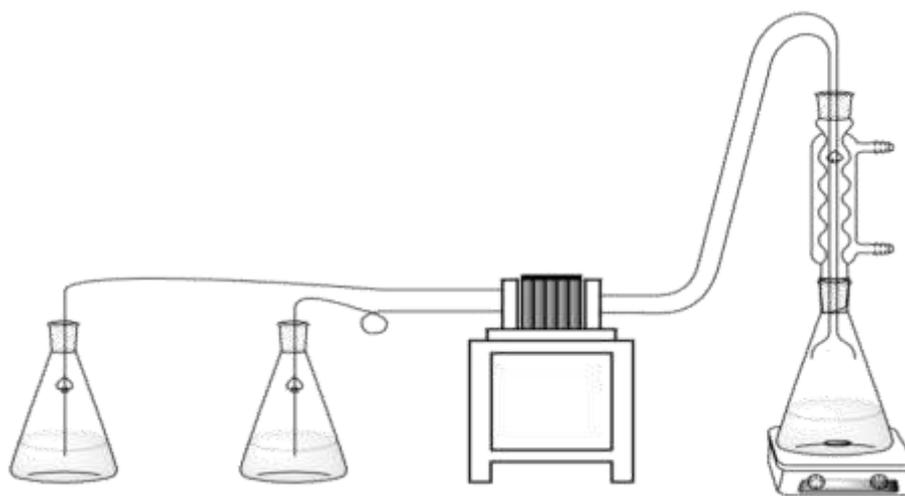


Figure II-1 : Schéma du montage utilisé comprenant les solutions de réactifs, une pompe péristaltique et la solution tampon.

Les premiers signes de précipitation (blanchiment de la solution) sont observés 3 à 10 min après le début de l'addition des deux solutions, dépendant des conditions du système : acidité et

température. L'addition complète des solutions est effectuée en 45 min.

Le précipité formé après addition complète est laissé 10 min sous agitation dans la solution mère à la température de précipitation puis filtré sur Büchner et lavé par 3 fois 1L d'eau déionisée avant d'être finalement séché à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

Les échantillons sont conservés à température ambiante dans un flacon étanche. Aucun signe d'évolution des composés n'a été observé après plus de 2 ans de stockage dans ces conditions.

A2 b) Techniques de caractérisation

Les descriptions des instruments utilisés pour les différentes caractérisations, diffraction des rayons X (DRX), analyses vibrationnelles infrarouge (FTIR) et Raman, microscopie électronique à balayage (MEB), analyses thermogravimétrique et thermodifférentielle, dosage des ions calcium et phosphate et mesure de la surface spécifique (BET) sont regroupés dans l'annexe 1.

B. Caractérisation de phases pures de pyrophosphate de calcium hydratés

Le protocole de synthèse décrit a permis la synthèse de quatre phases différentes de pyrophosphate de calcium hydraté, identifiées par comparaison avec la littérature. Cette partie s'attachera à la caractérisation de chacune de ces phases, les domaines de formations seront étudiés dans la partie Chapitre IIC sur la base des identifications et caractérisations de cette section.

La réaction de précipitation effectuée peut être décrite par l'équation (II-1) :



Elle aboutit à la formation de quatre produits de réaction différents. Quatre échantillons ont ainsi été sélectionnés pour effectuer une série de caractérisations physico-chimiques. Ces échantillons correspondent aux conditions de synthèse reproduites dans le tableau II-1, représentant les quatre phases obtenues lors de cette étude : a-CPP, une phase amorphe, m-CPPT β , une phase tétrahydratée, et les deux phases dihydratées observées *in vivo* m-CPPD et t-CPPD. Les références permettant leurs identifications seront discutées dans cette section.

Tableau II-1 : Conditions de synthèse, pH et température, des échantillons sélectionnés pour les caractérisations complémentaires ($[Ca^{2+}] = 2 [P_2O_7^{4-}] = 150 \text{ mmol.L}^{-1}$)

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

B1. Diffraction des rayons X

Les échantillons cristallins ont été identifiés par diffraction des rayons X (figure II-2) comme constitués des phases pures m-CPPT β , m-CPPD et t-CPPD, par comparaison avec les données publiées dans la littérature [Mandel, 1975; Davis *et al.*, 1985; Mandel *et al.*, 1988]. Ces échantillons semblent ne contenir qu'une phase chacun, indiquant leur pureté. Les paramètres de maille affinés sont reportés dans le tableau II-2 pour les phases cristallisées. Le quatrième diagramme, correspondant à la phase amorphe a-CPP présente un halo large et diffus caractéristique.

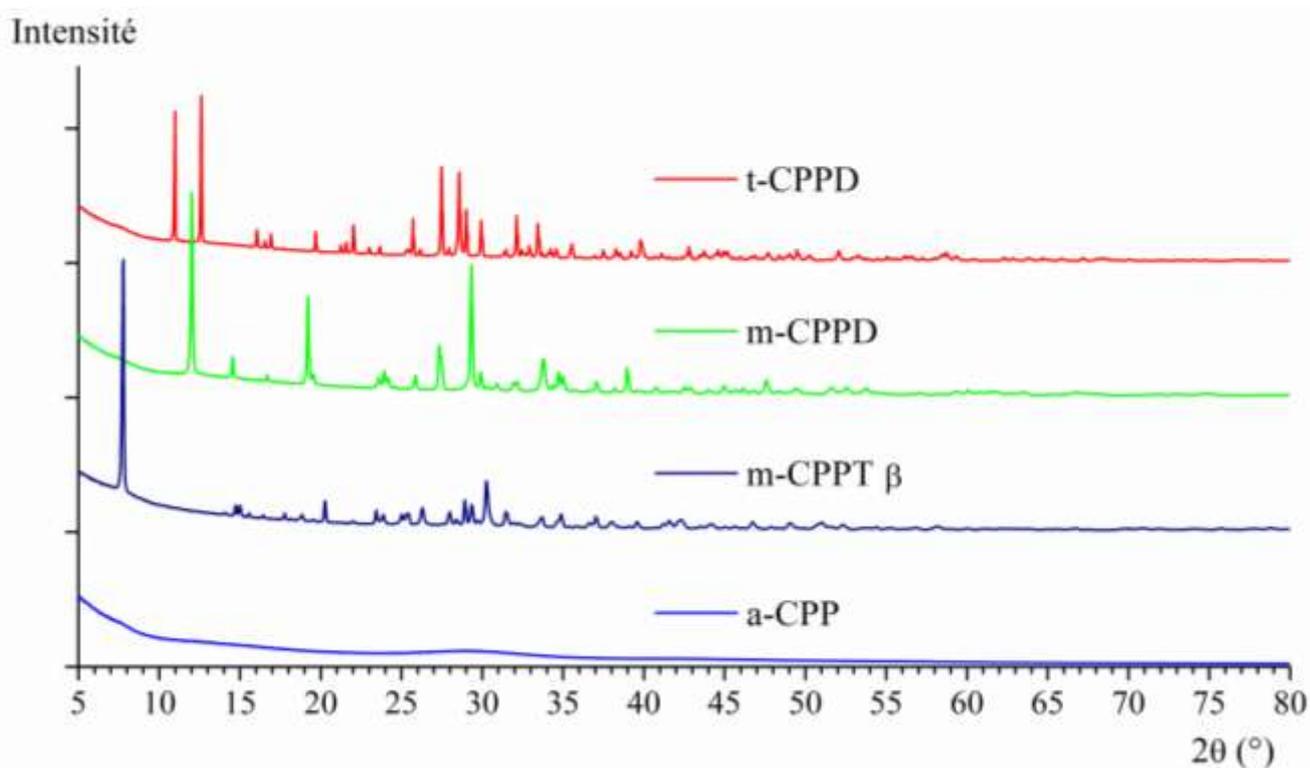


Figure II-2 : Diagrammes de diffraction des rayons X des phases de CPP synthétisés.

Bien que le diagramme de DRX obtenu pour l'échantillon de m-CPPD corresponde aux données publiées par Brown *et al.* et Liu *et al.* [Brown *et al.*, 1963; Liu *et al.*, 2009], les paramètres de maille proposés par Mandel *et al.* ne permettent pas une indexation satisfaisante des différentes raies du diagramme [Mandel *et al.*, 1988]. A notre connaissance, ces paramètres sont les seuls disponibles dans

la littérature, la structure n'ayant pas été publiée.

Une détermination des paramètres de maille a donc été réalisée en utilisant l'algorithme SVD-Index implémenté dans le logiciel TOPAS [Coelho, 2009]. La résolution de la structure du m-CPPD n'a cependant pas été possible à ce stade.

Tableau II-2 : Paramètres de maille obtenus pour les phases m-CPPT β , t-CPPD et m-CPPD comparés aux données publiées par Balić-Žunić *et al.* et Mandel [Mandel, 1975; Balić-Žunić *et al.*, 2000]. Les écart-types estimés sont indiqués entre parenthèses

	Ref.	Rp/ Rwp	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
m-CPPT β	affiné	0,0614/0,0789	12,288(1)	7,512(1)	10,776(1)	90,00	112,51(1)	90,00
	[Balić-Žunić <i>et al.</i> , 2000]		12,287(6)	7,511(3)	10,775(5)	90,00	112,54(1)	90,00
t-CPPD	affiné	0,0538/0,0684	7,359(5)	8,279(6)	6,690(5)	102,87(1)	72,73(1)	94,96(1)
	[Mandel, 1975]		7,365(4)	8,287(4)	6,691(4)	102,96(1)	72,73(1)	95,01(1)
m-CPPD	affiné	0,0772/0,1020	12,618(1)	9,250(1)	6,760(1)	90,00	104,97(1)	90,00

Une étude structurale plus détaillée sera présentée dans le chapitre III.

B2. Spectroscopies vibrationnelles : FTIR et Raman

Les spectroscopies infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et Raman permettent une identification claire et rapide des phases de phosphate de calcium, notamment pyrophosphate de calcium et fournissent des informations sur la conformation des ions pyrophosphates dans la structure. Grâce à la « flexibilité » de l'ion pyrophosphate, dont la configuration varie d'une structure à l'autre, les bandes de vibration de chacun des groupements de cette molécule sont caractéristiques des structures rencontrées et permettent de différencier chacune des phases synthétisées.

Une seule phase a cependant fait l'objet d'une étude vibrationnelle complète dans la littérature, la phase t-CPPD [Cornilsen, 1984], le manque de structure publiée pour les autres phases ne permettant pas ces études jusqu'à récemment. De plus, l'utilisation de la spectroscopie vibrationnelle a permis de confirmer l'absence d'ions PO_4^{3-} ou HPO_4^{2-} par l'absence des bandes associées, notamment dans les gammes $945\text{-}960\text{ cm}^{-1}$ et $860\text{-}880\text{ cm}^{-1}$ respectivement, et ce même dans les échantillons amorphes.

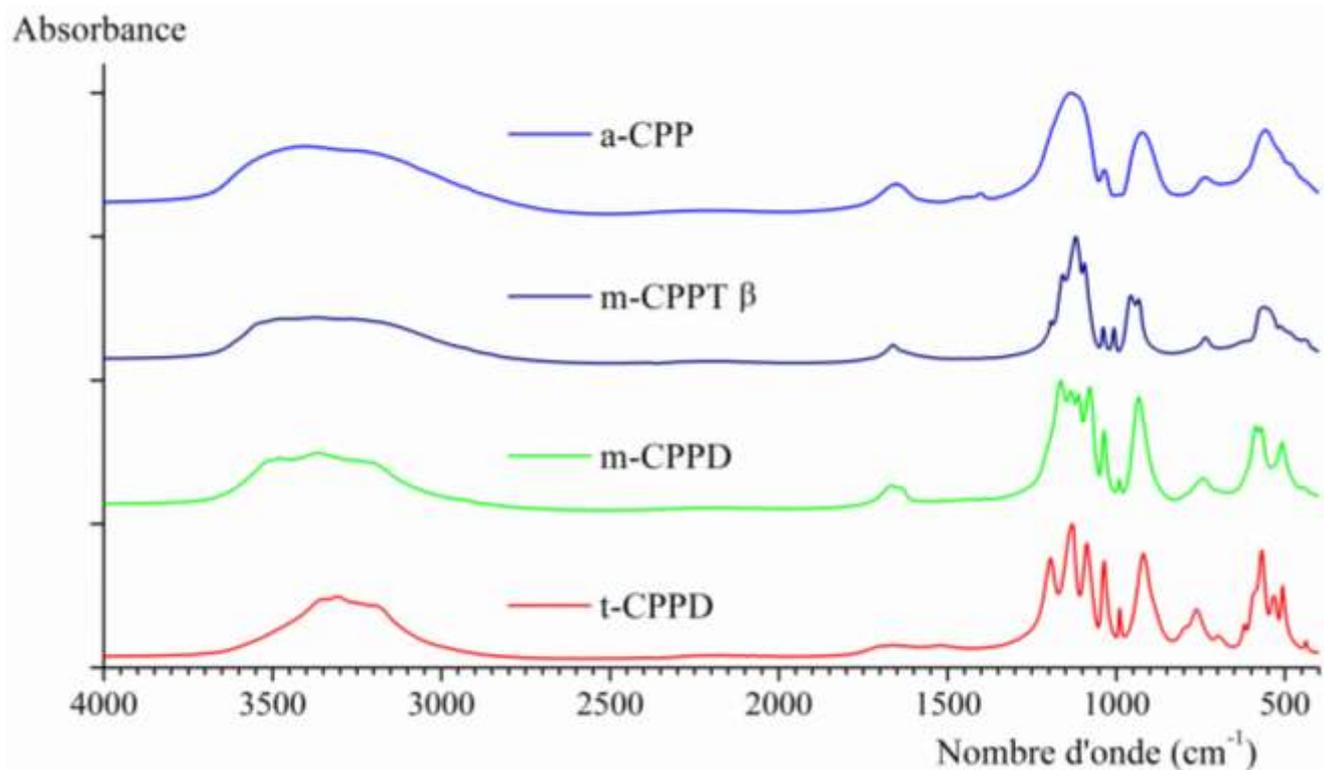
En accord avec Cornilsen [Cornilsen, 1984], le spectre de la structure t-CPPD contient un total

de 102 modes (51 A_g et 51 A_u), dont 42 sont attribués aux ions pyrophosphates : 21 modes actifs en Raman et 21 modes actifs en infrarouge sont prédits pour la structure t-CPPD. Malgré ces décompositions, les 21 vibrations associées à l'ion $P_2O_7^{4-}$ ne peuvent pas être séparées dans les spectres observés, bien que de nombreuses bandes présentent des épaulements. Celles-ci seront analysées suivant les domaines de vibration de l'ion libre. Huit modes d'élongation P-O peuvent être identifiés, dans l'ordre des nombres d'onde suivant : $\nu_{PO_4}^{as} > \nu_{PO_4}^s > \nu_{PO_4}^{as} > \nu_{POP}^{as} > \nu_{POP}^s$ (figure II-3 et II-4). Une attribution des bandes observées sur les spectres peut être réalisée sur cette base bien qu'elle ne couvre pas l'ensemble des bandes et épaulement observés. Les vibrations d'élongation P-O et P-O-P sont observées dans les spectres IR et/ou Raman des phases t-CPPD, m-CPPT β et m-CPPD entre 1250 et 950 cm^{-1} et dans la gamme 950 et 700 cm^{-1} , respectivement (tableau II-3). Mais la vibration ν_{POP}^{as} semble notamment dédoublée, particulièrement sur le spectre de la phase m-CPPT β .

Les vibrations des molécules d'eau se situent dans la gamme 3700–2800 cm^{-1} , avec des différences significatives entre les différentes phases de CPP considérées. Le spectre de la phase m-CPPD semble plus proche de celui de la structure de m-CPPT β , un tétrahydrate possédant un large réseau de molécule d'eau, sous forme de feuillets, que de celui du t-CPPD, un autre dihydrate. Cette similarité pourrait s'expliquer par un réseau étendu de molécules d'eau dans la structure. Une bande large et peu intense apparaît dans la zone 2400–1950 cm^{-1} . En absence d'ions H_3O^+ ou de liaison P-O-H, cette bande est attribuée à des vibrations composites de la molécule d'eau $(\delta+\omega)_{OH}$ [Sinyaev *et al.*, 2008].

Les figures II-3 et II-4 présentent les spectres FTIR et Raman des phases de CPP synthétisées : les positions et les attributions de bandes sont reportées dans le tableau II-3 pour les trois phases cristallines.

a)



b)

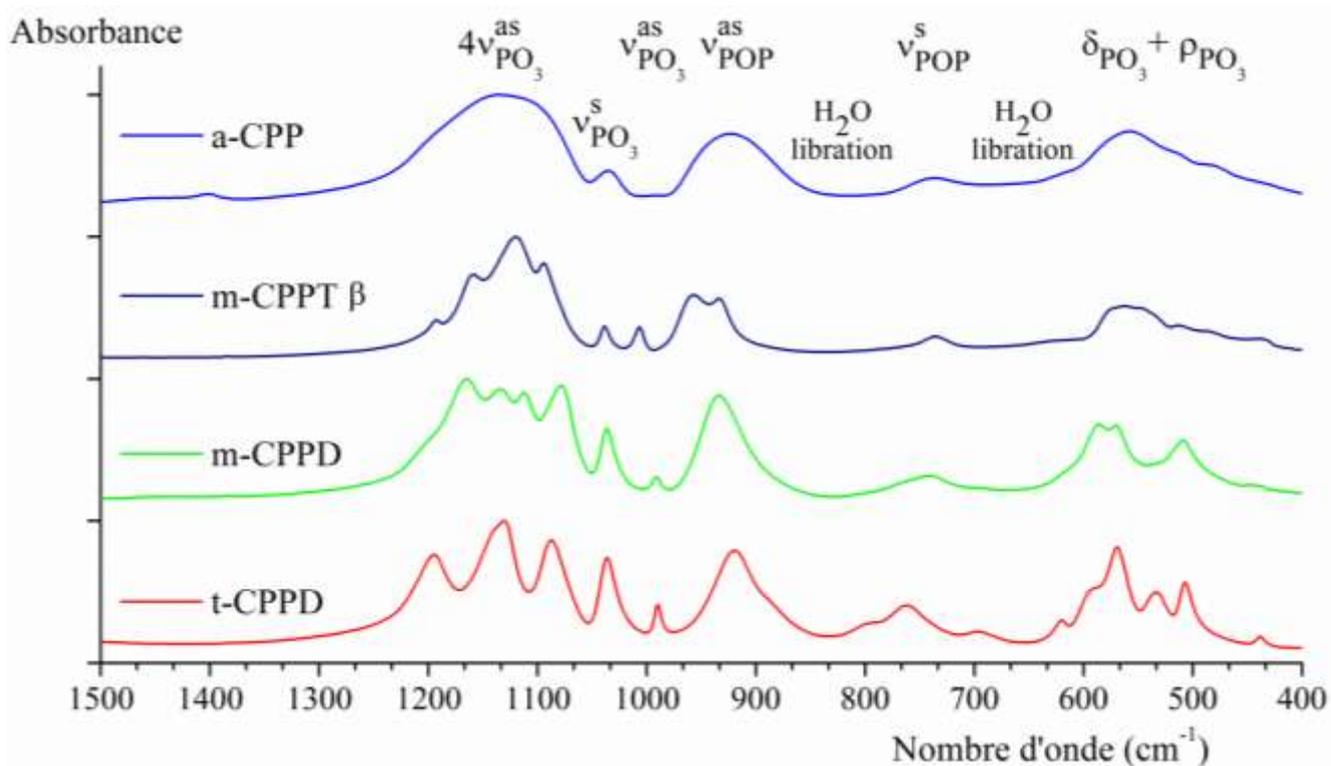
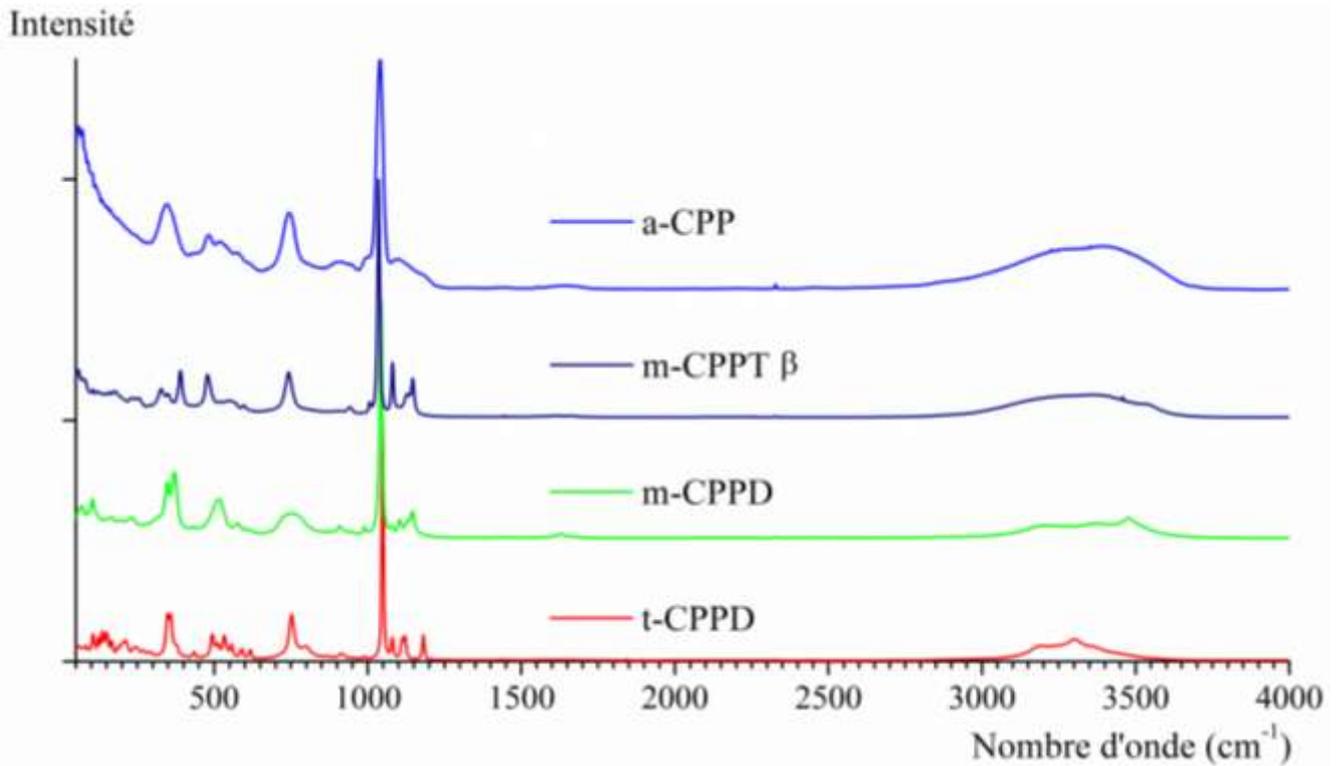


Figure II-3 : Spectres FTIR des quatre phases de CPP synthétisées présentés par domaines :
a) 4000–400 cm⁻¹ et b) 1300–500 cm⁻¹.

a)



b)

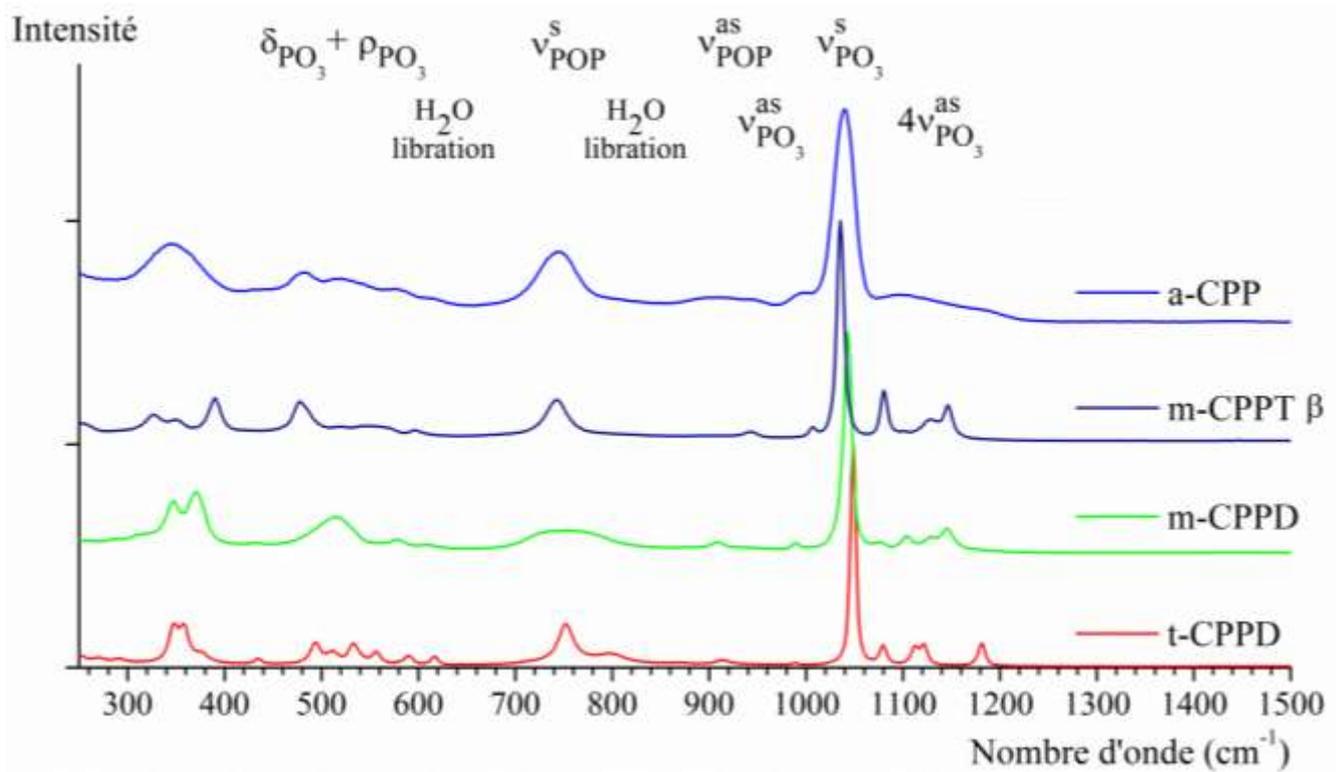


Figure II-4 : Spectres Raman des quatre phases de CPP synthétisées présentés par domaines :
a) 50–4000 cm⁻¹ et b) 250–1300 cm⁻¹

Tableau II-3 : Position des bandes de vibration (cm^{-1}) et leur attribution pour les composés m-CPPD, t-CPPD et m-CPPT β synthétisés.

t-CPPD		m-CPPT β		m-CPPD		Attributions
IR (cm^{-1})	Raman (cm^{-1})	IR (cm^{-1})	Raman (cm^{-1})	IR (cm^{-1})	Raman (cm^{-1})	
3576	3578	3615		3521	3525	
3511	3511	3551	3547	3476	3476	
3471	3464	3488		3366	3368	
3361	3368	3364	3386	3309		ν_{OH}
3305	3300	3263	3242	3249	3251	
3244	3242	3178	3168	3188	3193	
3182	3182	3047	3050			
1711		1662	1664	1669	1665	
1660		1620		1636	1628	δ_{HOH}
1522						
1195	1182	1193		1206		
1140	1121	1159	1147	1165	1147	
1130	1113	1120	1128	1134	1131	$\nu_{\text{PO}_3}^{\text{as}}$
1088	1080	1094	1101	1121	1106	
			1079	1078	1076	
1037	1049	1035	1036	1036	1045	$\nu_{\text{PO}_3}^{\text{s}}$
990	990	1007	1008	991	992	$\nu_{\text{PO}_3}^{\text{as}}$
920	916	957	945	934	941	
880	890	934				$\nu_{\text{POP}}^{\text{as}}$
798	797			802		H_2O libration
762	753	736	743	767	775	
				739	725	$\nu_{\text{POP}}^{\text{s}}$
696	705			691		H_2O libration
621	618	621	597	625	611	
594	590	576	573	589	579	
569	557	561	562	569	571	$\delta_{\text{PO}_3^+ \text{ PO}_3}$
534	533	549	547	509	518	
507	512	513	518			

Les données spectroscopiques nous renseignent aussi de manière directe sur la configuration de l'ion $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ et particulièrement sur l'angle de la liaison P-O-P, comme proposé par Rulmont *et al.*

[Rulmont *et al.*, 1991]. Dans les phases t-CPPD et m CPPT β , les ions $P_2O_7^{4-}$ présentent une configuration éclipse, avec une molécule coudée au niveau de la liaison P-O-P. Les valeurs reportées dans la bibliographie pour l'angle de la liaison P-O-P, soit $123,1^\circ$ pour t-CPPD et $134,1^\circ$ pour m-CPPD β [Mandel, 1975; Balić-Žunić *et al.*, 2000], représentent un extrême de la gamme établie sur plusieurs structures de sels de pyrophosphates, notamment autres que des sels de calcium, variant entre $123,1^\circ$ (t-CPPD) pour la structure dichromate, et 180° (β - $Cu_2P_2O_7$) [Rulmont *et al.*, 1991].

Ainsi deux types de structures ont été décrites par Brown et Calvo pour les composés de pyrophosphates : les structures thortveitite et dichromate [Brown & Calvo, 1970]. Les structures de composition $X_2Y_2O_7$ (Y= Si, P, As, Ge) avec un rayon ionique du cation divalent X inférieur à $0,97 \text{ \AA}$ (X= Mg, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) sont isostructurales de la thortveitite ($Sc_2Si_2O_7$) avec un angle de la liaison Y-O-Y variant de 140° à 180° , une torsion O-Y... Y-O de 60° (conformation décalée) et un tétraèdre YO_4 ayant un très faible degré de distorsion. A l'inverse, les structures ayant un cation X avec un rayon ionique supérieur à $0,97 \text{ \AA}$ (X= Ca, Sr, Ba) cristallisent en structure dichromate avec un angle Y-O-Y approximativement de 120° – 135° , une torsion Y... Y-O de 0° à 30° (conformation éclipse) et un tétraèdre YO_4 déformé sur la liaison P-O-P [Davis *et al.*, 1985]. Contrairement aux composés anhydres, les phases $Mn_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$, $Fe_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$, $Co_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ et $Mg_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ présentent une structure dichromate proche de la phase t-CPPD.

L'angle P-O-P dans la structure m-CPPD, et donc la conformation de l'ion $P_2O_7^{4-}$, peuvent être déterminés, approximativement, sur la base des vibrations observées en spectroscopie FTIR. L'ion $P_2O_7^{4-}$ peut être considéré comme un système à trois corps, si l'on ne considère pas les couplages entre la liaison P-O-P et les groupements PO_3 aux extrémités d'une part, et l'influence du calcium sur les vibrations P-O-P d'autre part. Dans cette approximation, les fréquences d'élongation observées en spectroscopie vibrationnelle dépendent de la valeur de l'angle P-O-P, noté θ , et de la constante de raideur k de la liaison P-O suivant les équations (II-2) et (II-3) :

$$v_{POP}^s = 1/2\pi c \sqrt{[k (1/m_P + (1 + \cos \theta)/m_O)]} \quad (II-2)$$

$$v_{POP}^{as} = 1/2\pi c \sqrt{[k (1/m_P + (1 - \cos \theta)/m_O)]} \quad (II-3)$$

m_O et m_P représentent la masse des atomes d'oxygène et de phosphore, ces derniers étant modifiés par leur interaction avec les groupements PO_3 , c représente la vitesse de la lumière dans le vide.

Lazarev propose une relation empirique entre ces différents paramètres, liée à la valeur Δ par l'équation (II-4) qui élimine la constante k [Lazarev, 1972] :

$$\Delta = (v_{\text{POP}}^{\text{as}} - v_{\text{POP}}^{\text{s}})/(v_{\text{POP}}^{\text{as}} + v_{\text{POP}}^{\text{s}}) = f(\theta) \quad (\text{II-4})$$

Cette relation fut appliquée avec succès aux pyrosilicates, pyrogermanates et pyrophosphates, étant valable sur une large majorité des composés testés. Certaines phases présentent cependant des déviations significatives par rapport à la courbe principale [Rulmont *et al.*, 1991]. Dans ces cas, les approximations signalées ci-dessus peuvent ne pas être validées, notamment à cause d'un cation, Cu^{2+} ou Sr^{2+} , présent dans leur structure.

La relation de Lazarev est cependant valable sur les phases de pyrophosphates de calcium testés, de structure dichromate (t-CPPD, m-CPPT β et les composés anhydres α - et β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), Δ étant une fonction linéaire de θ , et fut appliquée ici à m-CPPD. Plusieurs valeurs de l'angle P-O-P sont alors obtenues suivant la vibration considérée, 935 cm^{-1} pour la $v_{\text{POP}}^{\text{as}}$ et 799 cm^{-1} ou 768 cm^{-1} pour $v_{\text{POP}}^{\text{s}}$, les fréquences pour chaque vibration étant obtenues par déconvolution. La bande la plus intense à 768 cm^{-1} correspond à un angle de $133,6^\circ$ tandis que la valeur de $126,0^\circ$ pour la bande à 799 cm^{-1} . Cette dernière valeur se rapproche de celle pour l'angle P-O-P observé directement dans la structure de phase t-CPPD [Mandel, 1975] comparativement aux autres pyrophosphates de calcium, anhydres ou hydratés ($130,0^\circ$, $130,5^\circ$ et $137,8^\circ$ (deux sites), $134,1^\circ$ et $123,0^\circ$ pour α - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, m-CPPT β et t-CPPD respectivement [Webb, 1966; Calvo, 1968; Mandel, 1975; Balić-Žunić *et al.*, 2000]). La comparaison peut aussi être faite avec les structures $\text{Mn}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($127,5^\circ$, $125,9^\circ$, $126,2^\circ$, $125,7^\circ$) qui présentent toutes des angles relativement fermés, autour de 126° [Schneider & Collin, 1973; Oka & Kawahara, 1982; Effenberger & Pertlik, 1993; Giesber III *et al.*, 2000].

D'autres aspects de la conformation de l'anion pyrophosphate sont aussi observable par spectroscopie, notamment la déformation des tétraèdres composant la molécule. Mandel a relié l'angle de la liaison P-O-P à la distance P-O sur cette même liaison, donnant une valeur comprise entre 1,61 et 1,63 Å pour le m-CPPD, soit des tétraèdres fortement déformés. Cette relation a été établie par Cruickshank, en se basant sur l'hypothèse que le recouvrement $d\pi$ - $p\pi$ de la liaison P-O évolue avec l'angle P-O-P [Cruickshank, 1961]. Pour un angle d'environ 130° , le recouvrement sera altéré pour les liaisons P-O engagée dans le pont P-O-P, conduisant à une longueur de la liaison plus grande. A l'inverse, un angle proche de 180° renforcerait la liaison P-O-P, recevant sur l'oxygène central les contributions à caractère π des orbitales p contenues dans l'axe de la liaison et perpendiculairement, aboutissant à des tétraèdres réguliers.

La déformation des tétraèdres peut aussi être observée directement par comparaison entre les

modes de déformation de groupement PO_3 entre 700 et 400 cm^{-1} et les modes d'élongations entre 1250 et 950 cm^{-1} observés par spectroscopie Raman et FTIR. La coïncidence des bandes entre FTIR et Raman indique une structure non centrosymétrique, s'orientant vers des tétraèdres non réguliers.

B3. Analyses chimiques

Des analyses chimiques complémentaires ont été réalisées pour déterminer finement la composition des échantillons synthétisés. Plusieurs défauts issus de la cristallisation, notamment de substitution, peuvent être quantifiés par le rapport Ca/P. Une réaction secondaire d'hydrolyse des ions pyrophosphates peut également induire une modification de la composition des échantillons obtenus sans changer le rapport Ca/P. L'hydrolyse des ions pyrophosphates conduit à la formation de deux ions hydrogénophosphates selon l'équation (II-5) :



Dans la littérature, cette hydrolyse a été observée suivant deux processus différents : une hydrolyse interne, se produisant par réaction de l'eau contenue dans les différentes phases, et une hydrolyse externe, ayant lieu en solution [Slater *et al.*, 2011]. L'hydrolyse interne a été observée dans la phase amorphe a-CPP à température modérée, dès 37°C . Les molécules d'eau contenues dans la phase réagissent avec les molécules de pyrophosphates environnantes pour former de faibles quantités d'ions orthophosphates [Slater *et al.*, 2011]. Ce phénomène est cependant négligeable sur un temps court à des températures inférieures à 140°C .

A plus basse température, une hydrolyse des ions $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ a été observée en solution. Cette réaction est favorisée en milieu acide et à haute température, supérieures à 70°C . Ainsi, suivant les conditions de synthèse utilisées, d'importantes quantités d'ions orthophosphates peuvent potentiellement se former en solution. La quantité d'ions présente dans les phases cristallines peut cependant être plus faible que celle en solution. L'ion hydrogénophosphate est un inhibiteur de cristallisation des pyrophosphates de calcium, et aucune phase cristalline combinant pyrophosphate et orthophosphate n'est, à notre connaissance, reportée [Cheng & Pritzker, 1983]. Cela pourrait en partie expliquer la synthèse d'une phase amorphe de pyrophosphate de calcium à haute température, bien qu'aucune trace d'ion orthophosphate n'ait été détectée dans les échantillons synthétisés à 90°C et pH 5,8. L'effet réciproque, des ions pyrophosphates sur l'inhibition de la cristallisation des orthophosphates de calcium, semble beaucoup plus marqué, avec une inhibition rapportée dans la littérature dès que le rapport orthophosphate/pyrophosphate atteint 100/1 tandis que l'inhibition de cristallisation des CPP se produit pour des rapports 3/1 et inférieurs [Cheng & Pritzker, 1983]. De

plus, les différentes phases cristallines de CPP présentent en milieu acide une solubilité plus faible que les orthophosphates de calcium, notamment la brushite (t-CPPD $pK_s = 18,35$; m-CPPD $pK_s = 17,6$; m-CPPT β $pK_s = 17,7$) [Christoffersen *et al.*, 2000]. Cela pourrait favoriser la formation de phase pure de CPP dans ces conditions.

Ainsi le dosage des ions orthophosphates (PO_4^{3-} et HPO_4^{2-}) et pyrophosphate ($P_2O_7^{4-}$) a été réalisé afin d'obtenir le pourcentage d'hydrolyse au cours de la synthèse. Les résultats reportés dans le tableau II-4 indiquent que l'hydrolyse des ions pyrophosphates serait limitée à environ 2% des ions phosphates présents dans la phase cristalline. Cette quantité peut aussi s'être formée lors de la préparation des échantillons en vue du dosage ; de plus, elle correspond à la limite de détection de la méthode utilisée. Les concentrations plus hautes observées pour la phase amorphe, synthétisée à pH 5,8 et à une température de 25°C, indiquent soit la propension plus grande de cette phase à incorporer les ions hydrogénophosphates, soit une hydrolyse plus facile de ce composé après sa formation, reliée à sa solubilité plus grande. Les conditions de synthèse utilisées visent cependant à réduire le phénomène d'hydrolyse, notamment par l'utilisation d'un temps très court de synthèse comparé aux méthodes reportées dans la littérature.

Le rapport atomique calcium/phosphore (Ca/P) est communément utilisé pour les composés d'orthophosphates de calcium afin de partiellement identifier les phases cristallines et les écarts à la stoechiométrie (lacunes en calcium). Le rapport Ca/P des phases pyrophosphates synthétisées est conforme à celui attendu pour toutes les phases de CPP, soit $Ca/P=1$. Il correspond aussi au rapport Ca/P de deux phases de phosphates de calcium : le phosphate dicalcique anhydre, monérite $CaHPO_4$, et dihydraté, brushite, $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$.

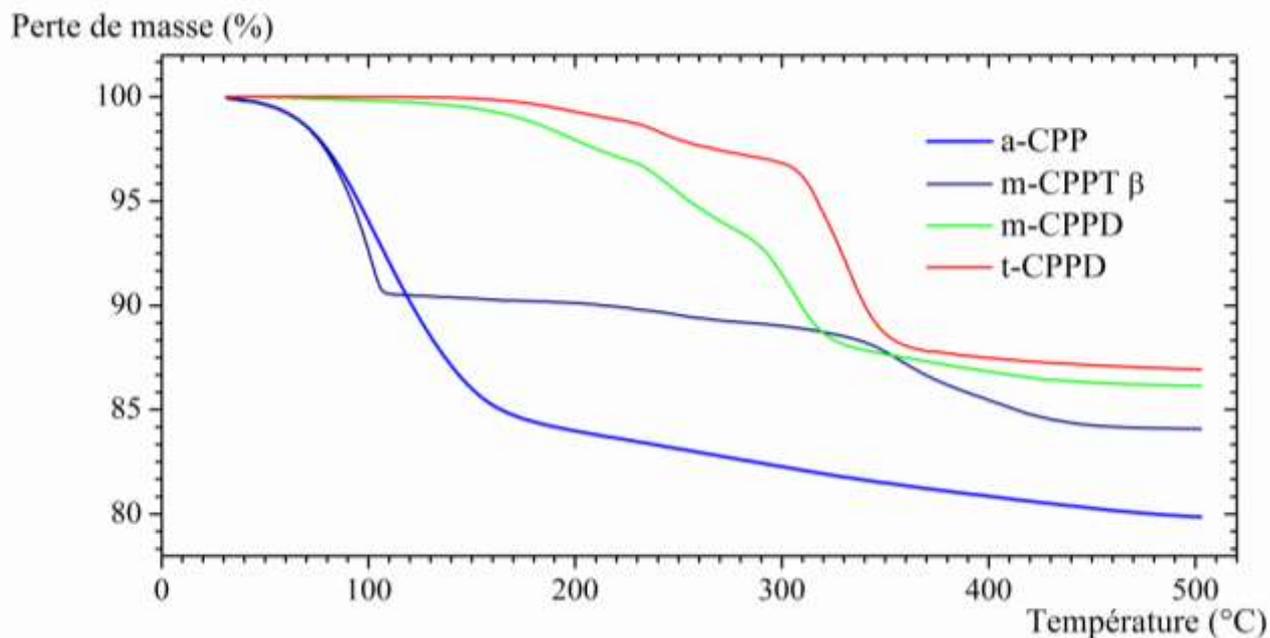
Tableau II-4 : Quantités de Phosphore (sous forme $P_2O_7^{4-}$, PO_4^{3-} ou HPO_4^{2-} , %_{massique}) et de Calcium (%_{massique}) déterminées par analyse chimique pour les phases t-CPPD, m-CPPD, m-CPPT β et a-CPP synthétisées.

	P : $P_2O_7^{4-}$ (% _{massique})	P : PO_4^{3-} or HPO_4^{2-} (% _{massique})	Ca : Ca^{2+} (% _{massique})	Ca/P
t-CPPD	21,2	0,29	27,6	1,01
m-CPPD	21,2	0,57	27,6	1,01
m-CPPT β	19,1	0,23	24,6	1,00
a-CPP	19,5	0,86	25,2	1,00

B4. Analyses thermogravimétriques

Des analyses thermogravimétriques (ATG) ont été réalisées afin d'étudier les évolutions des pyrophosphates de calcium à haute température, jusqu'à 500°C, à 5 K.min⁻¹ sous flux d'azote. L'examen des thermogrammes présentés sur la figure II-5 montre que les pertes de masse se produisent en trois étapes pour les composés dihydratés et en quatre étapes pour m-CPPT β. Plusieurs événements sont aussi visibles en analyse thermique différentielle (ATD).

a)



b)

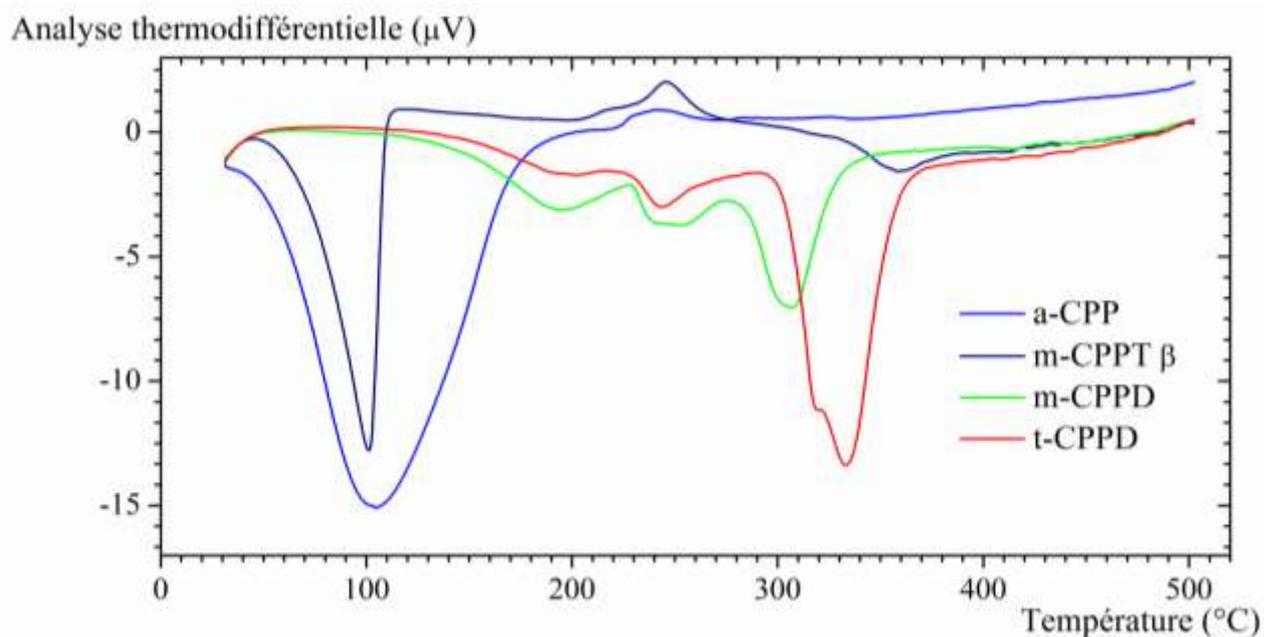


Figure II-5 : Diagrammes a) ATG et b) ATD des phases de CPP synthétisées.

Les pertes de masses correspondant approximativement à une demi-molécule d'eau (0,45 H₂O) et une molécule d'eau (1,11 H₂O) sont observées respectivement pour t-CPPD et m-CPPD entre 30 et 275°C. Deux étapes de déshydratation sont visibles dans cette gamme de températures sur les thermogrammes ATG, corrélées à deux larges pics exothermiques sur les thermogrammes ATD pour chacun des composés. Une troisième étape de déshydratation se produit entre 275°C et 375°C pour t-CPPD et entre 275°C et 350°C pour m-CPPD. Les thermogrammes ATD indiquent que ces pertes d'eau correspondent à deux pics endothermiques pour chacune des phases, à 315°C et 330°C pour t-CPPD et 300°C et 305°C pour m-CPPD. Le produit final de déshydratation, analysé par DRX, correspond à la phase β-Ca₂P₂O₇.

Les analyses thermogravimétriques ont été en partie décrites dans la littérature pour la phase m-CPPD β, avec une perte d'eau se produisant à basse température, sous 70°C [Balić-Žunić *et al.*, 2000; Gras *et al.*, 2013b]. Cette perte d'eau a été reliée à la position particulière d'une molécule d'eau dans la structure de cette phase. Cette molécule est maintenue dans la structure exclusivement par liaison hydrogène. La perte de cette première molécule d'eau (0,90 H₂O) est observée dès le pallier de stabilisation en température, ayant lieu à 30°C pendant 30 min. Une deuxième étape de déshydratation correspondant à la perte de deux molécules d'eau a lieu entre 80 et 110°C. Finalement, le composé évolue vers la phase anhydre β-Ca₂P₂O₇ après une troisième déshydratation entre 300°C et 450°C.

Plusieurs mécanismes de déshydratation, non précédemment observés dans la littérature pour ce composé, ont lieu au cours de la montée en température. Chacune des trois étapes de déshydratation sont en accord avec la structure publiée, correspondant à la perte des molécules d'eau respectivement coordonnées 0, 1 et 2 fois avec les différents atomes de calcium. La pente douce observée entre 110°C et 300°C est décomposée en deux événements exothermiques, élucidés par FTIR et DRX (cf. chapitre IV) comme une hydrolyse interne, décrite par l'équation (II-5) et donnant, à partir du pyrophosphate de calcium monohydraté, le phosphate dicalcique anhydre ou monéтите selon l'équation (II-6) :



Cette réaction retarde la perte de la dernière molécule d'eau, qui se reformera après condensation de la molécule de pyrophosphate P₂O₇⁴⁻, donnant la phase β-Ca₂P₂O₇ selon la réaction II-7 :



Ce mécanisme de déshydratation par hydrolyse de l'ion pyrophosphate n'a été observé, pour les phases cristallines, que dans le cas de la phase m-CPPT β

La phase amorphe présente une perte de masse continue durant la montée en température, de 30°C à 500°C, y compris durant le pallier de stabilisation. La perte totale de masse correspond à 3,87 molécules d'eau, valeur comprise dans la gamme reportée par Slater *et al.* variant de 3,8 à 4,2 molécules d'eau [Slater *et al.*, 2011]. Un pic exothermique est observé entre 110 et 250°C, correspondant à la gamme d'hydrolyse de la molécule de pyrophosphate pour m-CPPT β et où m-CPPD et t-CPPD subissent leur première étape de déshydratation. Le phénomène exothermique est analysé comme étant une hydrolyse interne partielle autour de 220°C par Slater *et al.* [Slater *et al.*, 2011].

Les pertes de masse sont reportées dans le tableau II-5. Les valeurs déterminées à partir des thermogrammes correspondent bien aux degrés d'hydratation attendus pour ces phases cristallines.

Tableau II-5 : Pertes de masse totales des phases de CPP hydratées synthétisées en nombre de molécule d'eau par unité formulaire $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$

	t-CPPD	m-CPPD	m-CPPT β^a	a-CPP ^a
H₂O par Ca₂P₂O₇	2,12	2,14	3,73	3,87

^a Incluant les pertes de masse durant le plateau préliminaire à 30 °C: a-CPP 0,31 H₂O et m-CPPT β 0,90 H₂O

B5. Observations microscopiques

Les faciès des cristaux ou particules obtenus, dans les conditions de synthèse précisées dans les paragraphes précédents, ont été observés au microscope électronique à balayage (MEB) (figure II-6). Pour rappel, le faciès est représentatif de l'aspect extérieur du cristal, de sa forme générale, alors que la morphologie, ou l'habitus, représente la forme du cristal au sens cristallographique, par indexation et regroupement des faces observées suivant la symétrie du système. Les cristaux des phases dihydratées présentent des faciès aciculaires avec une large hétérogénéité de taille. Les cristaux de la phase t-CPPD semblent plus larges et épais que ceux de m-CPPD. Les cristaux de t-CPPD peuvent présenter deux faciès différents, avec les faces aux extrémités présentant des angles soit d'environ 90° soit d'environ 45° par rapport aux faces les plus développées. Les cristaux de m-CPPD se présentent sous forme rassemblée, semblables à des fagots, larges aux extrémités et resserrés au centre. Ces structures peuvent être reliées à des mécanismes de croissance de sphérulites, notamment de sphérulites de catégorie 2 décrites par Gránásy *et al.* [Gránásy *et al.*, 2005].

Cette organisation est due, suivant le modèle choisi, à la nucléation homogène d'un cristal aciculaire suivi par la croissance de la sphérulite par nucléation hétérogène aux extrémités des aiguilles formées. Les tailles mesurées varient dans une gamme de 1 μm à 30 μm pour les cristaux de t-CPPD, avec une largeur maximale de 5 μm , et de 1 μm à 25 μm pour les cristaux de m-CPPD, avec une largeur maximale de 1 μm .

m-CPPT β présente un faciès plat, sous forme de lamelles hexagonales avec un grand axe de 20 μm . Balić-Žunić *et al.* [Balić-Žunić *et al.*, 2000] a relié ce faciès à la morphologie comprenant les faces {100}, {001} et {011} et donc à la structure en couche de cette phase, alternant une couche de molécules d'eau, maintenue par liaison hydrogène, à une couche compacte contenant les ions pyrophosphates et calcium.

Le faciès de la phase a-CPP consiste en des particules relativement sphériques de 100 nm de diamètre environ.

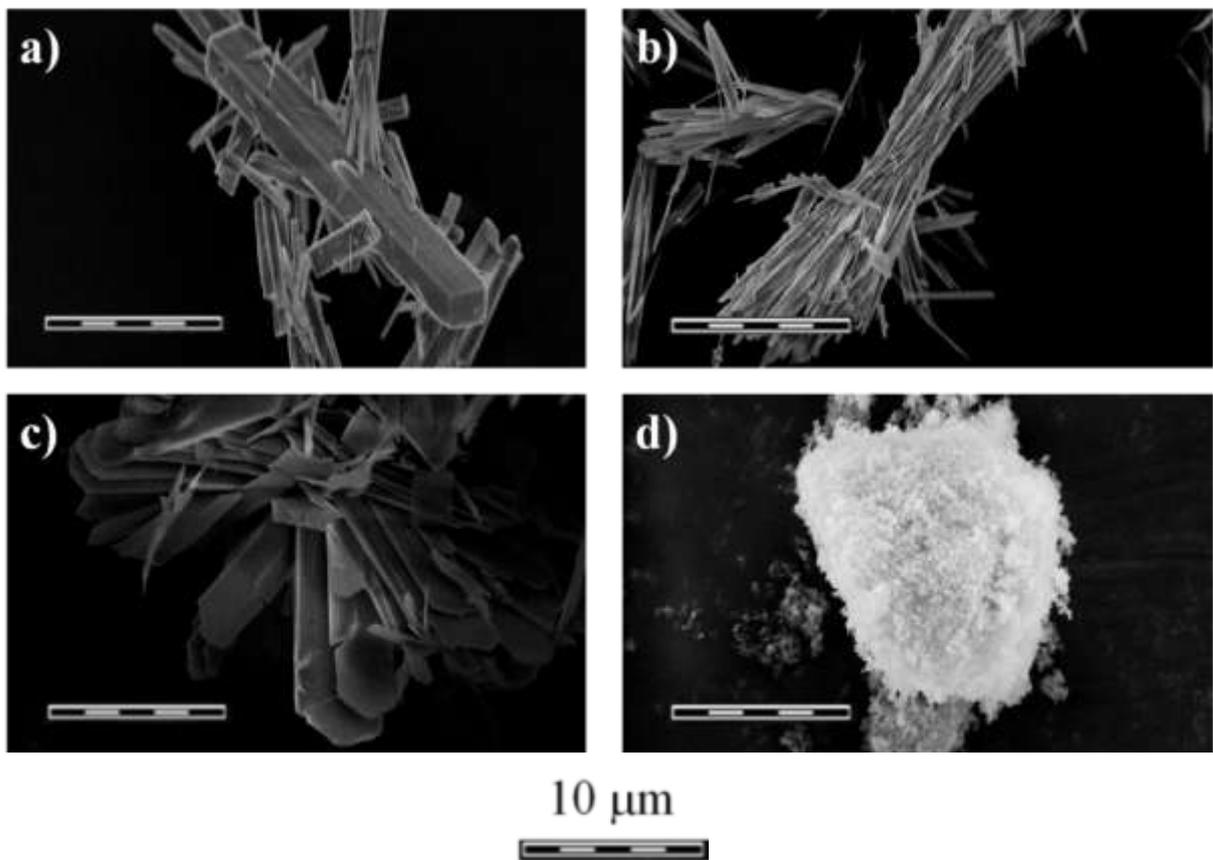


Figure II-6 : Images MEB des quatre phases de CPP synthétisées : a) t-CPPD, b) m-CPPD, c) m-CPPT β et d) a-CPP

Il a été reporté dans la littérature que les cristaux de CPP peuvent être synthétisés avec une large

gamme de taille et présenter différents faciès et morphologies [Mandel *et al.*, 1988; Wierzbicki & Cheung, 1998]. Ces différences peuvent influencer les réactivités de surface, et donc les phénomènes de dissolution/croissance ou le potentiel inflammatoire de chacune des phases. Christoffersen *et al.* ont par exemple étudié l'influence de la morphologie sur la croissance et la dissolution de la phase t-CPPD [Christoffersen *et al.*, 1999, 2001, 2002]. Les différences de faciès peuvent en partie expliquer les différences de potentiel inflammatoire, un faciès aciculaire étant plus inflammatoire qu'un faciès cubique [Roch-Arveiller *et al.*, 1990].

B6. Surface spécifique

La surface spécifique des quatre phases de CPP peut aussi influencer le potentiel inflammatoire. Les différentes valeurs déterminées par analyse selon la méthode BET des phases CPP synthétisées sont les suivantes : $1,3 \pm 0,1 \text{ m}^2/\text{g}$ pour t-CPPD, $5,0 \pm 0,2 \text{ m}^2/\text{g}$ pour m-CPPD, $4,8 \pm 0,2 \text{ m}^2/\text{g}$ pour m-CPPT β et $25,7 \pm 0,5 \text{ m}^2/\text{g}$ pour a-CPP, sont faibles mais en accord avec la taille des cristaux/particules observées sur les images MEB et avec la littérature [Roch-Arveiller *et al.*, 1990; Winternitz *et al.*, 1996].

Ces caractérisations complémentaires ont permis l'identification des quatre échantillons comme étant des phases pures de pyrophosphate de calcium hydraté et ont permis d'établir des données de référence pour les prochaines analyses.

C. Etude de la formation de pyrophosphate de calcium par double décomposition

Le procédé mis en place dans le cadre de notre étude concernant la formation de phases pures de pyrophosphates de calcium hydratés met en évidence la formation de quatre phases de pyrophosphates de calcium hydratés, dans une gamme de températures allant de 25°C à 90°C pour un pH compris dans la gamme pH 3,6-pH 7,4. L'impact de ces conditions sur la formation de pyrophosphate de calcium hydraté est étudié ici en se basant sur les caractérisations des échantillons purs présentés dans la section Chapitre IIB.

C1. Domaines de formation

Les conditions correspondant aux domaines de formation des phases pures de CPP hydratés tels qu'obtenus par cette méthode de synthèse sont décrits dans la figure II-7.

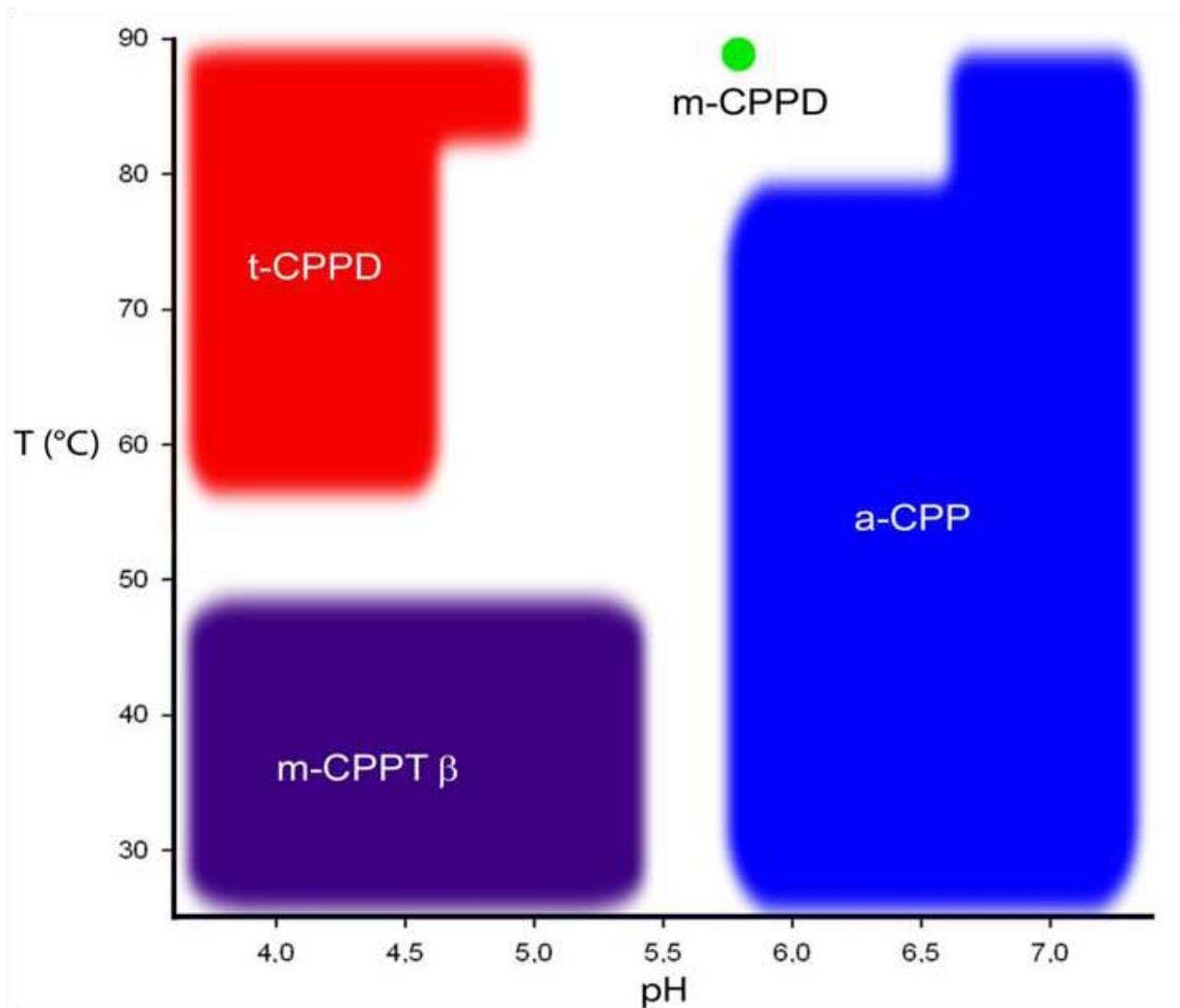


Figure II-7 : Domaines de synthèse déterminés pour les quatre phases de CPP hydraté purs. Des mélanges de phases sont obtenus pour les conditions à l'extérieur des limites de ces domaines

Pour une concentration donnée d'ions pyrophosphates et calcium, respectivement 75 mmol.L^{-1} et 150 mmol.L^{-1} dans les solutions de réactifs, quatre domaines ont été définis correspondant aux quatre phases de pyrophosphate de calcium hydraté : a-CPP et m-CPPT sont formées à basse température ou pH faiblement acide, et les deux phases dihydratées observées *in vivo* m-CPPD et t-CPPD, sont synthétisées à plus haute température. Des mélanges de phases ont été obtenus pour des conditions de pH et de température correspondant à des points situés entre les domaines de formation de phases pures. Ces mélanges sont généralement constitués de deux phases de CPP, dont une phase amorphe pour des conditions de pH supérieur à 4,5 et des températures inférieures à 70°C .

Les composés synthétisés dans les domaines définis ont des domaines de cohérence supérieurs à 100 nm, déterminés en utilisant la formule de Scherrer. Les rendements de synthèse sont supérieurs à 90% pour les phases cristallisées et 85% pour la phase amorphe, pour n'importe quel point de leur

domaine de formation respectif, aboutissant à environ 4,5 g de produit par synthèse. Aucune différence morphologique significative n'a été observée en fonction de la température dans chacun des domaines testés, les synthèses effectuées en milieu plus acide (pH = 3,6) favorisant la formation de cristaux de m-CPPT β facettés et d'aiguilles plus longues et plus larges pour le t-CPPD.

Les conditions de synthèse utilisées lors de la synthèse des phases t-CPPD et m-CPPT β ont été décrites précédemment pour la synthèse de ces phases à partir de l'intermédiaire amorphe a-CPP, avec des températures inférieures à 50°C et un pH supérieur à pH 5 pour la phase m-CPPT β et un milieu acide à reflux pour la phase t-CPPD [Brown *et al.*, 1963; Mandel *et al.*, 1988; Christoffersen *et al.*, 2000; Groves *et al.*, 2007]. Les synthèses décrites dans cette étude ont été effectuées en 45 min, contre 24 h à 1 semaine pour l'évolution de la phase amorphe.

L'un des atouts majeurs de cette synthèse repose sur la synthèse de la phase m-CPPD, une phase observée dans les articulations de patients arthritiques, associée à t-CPPD [Kohn *et al.*, 1962], et possédant un potentiel inflammatoire plus élevé que cette dernière [Roch-Arveiller *et al.*, 1990; Swan *et al.*, 1995]. m-CPPD est cependant relativement peu étudiée, la synthèse de cette phase pure étant décrite comme non reproductible, la phase t-CPPD étant souvent présente dans l'échantillon formé, et impliquant la présence d'ions Mg^{2+} [Brown *et al.*, 1963; Cheng *et al.*, 1980; Mandel *et al.*, 1988; Winternitz *et al.*, 1996; Christoffersen & Christoffersen, 2003].

La figure II-7 indique une zone étroite de conditions opératoires pour la synthèse de la phase m-CPPD : une baisse de la température conduit à la formation de la phase amorphe ou du m-CPPT β tandis qu'une baisse du pH ou un temps de synthèse prolongé conduit à la formation de t-CPPD. Ces changements de conditions opératoires ont déjà été décrites dans la littérature pour l'évolution de la phase amorphe, sans cependant donner de gamme de conditions de synthèse pour le m-CPPD [Brown *et al.*, 1963]. Les conditions de synthèse décrites dans notre étude, pH 5,8 et 90°C pendant 45 min, permettent la formation de m-CPPD tout en évitant la transition en t-CPPD mentionnée par Brown *et al.* [Brown *et al.*, 1963]. Une fois les cristaux formés, ceux-ci peuvent être conservés dans la solution mère pendant 1 mois à des températures inférieures à 50°C sans présenter d'évolution en t-CPPD.

La synthèse de m-CPPD que nous avons mise au point est réalisée sans ajout d'ions Mg^{2+} , bien que la formation de cette phase ait été reportée comme fortement dépendante de la concentration en Mg^{2+} . De fortes concentrations de cet ion, jusqu'à une concentration égale à un quart des ions calcium, ont été utilisées dans plusieurs travaux afin de favoriser la formation de m-CPPD, comme décrit par Cheng *et al.* [Cheng *et al.*, 1980; Cheng & Pritzker, 1981], et reprises dans ce but par Mandel *et al.* [Mandel *et al.*, 1988]. Cependant, les ions pyrophosphates sont cinq fois plus efficaces

pour séquestrer les ions magnésium plutôt que les ions calcium et peuvent précipiter sous forme de pyrophosphate de magnésium [Van Wazer & Callis, 1958; Cheng & Pritzker, 1981]. Cette remarque peut expliquer, au moins partiellement, la difficulté d'obtention d'une phase m-CPPD pure, et le manque de caractérisation de cette phase ; la structure étant toujours inconnue 50 ans après la première synthèse publiée et les premières analyses par DRX reportées [Brown *et al.*, 1963]. Le sel de calcium utilisé contient moins de 100 ppm d'ions Mg^{2+} , analyse du fournisseur, le magnésium étant la principale impureté contenue dans les sels de calcium commerciaux.

C2. Etude en concentration pour l'obtention de la phase m-CPPD

Afin de connaître plus en détail les conditions de synthèse de cette phase m-CPPD identifiée dans les articulations de patients arthritique, différents paramètres ont été explorés. Des synthèses à différents rapports molaires calcium/pyrophosphate ont été réalisées de $[Ca^{2+}] = [P_2O_7^{4-}]$ à $[Ca^{2+}] = 4 [P_2O_7^{4-}]$, avec $[Ca^{2+}] = 150 \text{ mmol.L}^{-1}$. Le pH et la température sont identiques pour chaque expérience, à des valeurs correspondant aux conditions de synthèse du m-CPPD (pH 5,8 et 90°C). Un mélange de phase t-CPPD et m-CPPD apparaît pour des rapports molaires $[Ca^{2+}] = 1.5 [P_2O_7^{4-}]$ et inférieurs et une phase amorphe de a-CPP se forme pour des rapports molaires $[Ca^{2+}] = 3 [P_2O_7^{4-}]$ et supérieurs. L'ajout direct de la solution de calcium dans une solution de pyrophosphate $[P_2O_7^{4-}] = 75 \text{ mmol.L}^{-1}$ tamponnée conduit à la formation d'une phase identifiée par DRX et spectroscopie FTIR comme étant un tétrapotassium hexakis(pyrophosphate) de décacalcium nonahydraté $Ca_{10}K_4(P_2O_7)_6 \cdot 9H_2O$ [Mathew & Ammon, 1995]. L'ajout direct de la solution de pyrophosphate dans une solution de calcium $[Ca^{2+}] = 150 \text{ mmol.L}^{-1}$ tamponnée conduit à la formation d'une phase amorphe.

On observe ainsi, dans ce protocole, la très faible gamme de concentration, température et pH aboutissant à la formation de la phase m-CPPD.

D. Conclusions

Le protocole établi permet pour la première fois la synthèse rapide et reproductible de phases pures de pyrophosphate de calcium hydraté d'intérêt biologique, en contrôlant notamment la température et le pH utilisés lors de la synthèse.

Quatre phases pures de CPP ont été obtenues en une seule étape, sans intermédiaire de réaction, par double décomposition de sel de pyrophosphate de potassium et de nitrate de calcium : deux phases de pyrophosphate de calcium dihydraté (CPPD: $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) monoclinique et triclinique, détectées dans les articulations de patients arthritiques, une phase de pyrophosphate de calcium tétrahydraté monoclinique (CPPT: $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et une phase amorphe (a-CPP: $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$).

Quatre domaines de formation de CPP correspondant aux quatre phases citées ont été identifiés, dans les conditions de synthèses testées comprenant les conditions physiologiques (pH 7,4 et 37°C).

Plusieurs caractérisations complémentaires ont été réalisées sur chacune des phases obtenues : Les différentes caractérisations des phases notamment par diffraction des RX, spectroscopies vibrationnelles, analyses thermogravimétriques et analyses chimiques ont permis d'identifier les phases synthétisées et de vérifier leurs puretés. Ces résultats pourront être utilisés lors du diagnostic de tissus cartilagineux ou fluides synoviaux prélevés sur des patients arthritiques. Ils permettent aussi de mieux comprendre les possibles différences de potentiel inflammatoire entre les différentes phases.

Une étude plus poussée de ces composés, réalisée au chapitre suivant, est cependant utile afin d'identifier les causes de cette inflammation, notamment en reliant structure, morphologie et réactivité de surface.

Chapitre III

Caractérisations fines
des phases de
pyrophosphate de calcium hydratées

Dans les chapitres précédents, nous avons présenté l'état de l'art sur les différentes phases hydratées de pyrophosphate de calcium d'intérêt biologique ainsi qu'une nouvelle méthode pour leur synthèse et enfin leur caractérisation physico-chimique. L'objectif principal de ce chapitre est de décrire le plus précisément possible ces différentes phases à plusieurs échelles : atomique, moléculaire ainsi qu'à l'échelle du cristal. Ces informations seront importantes pour mieux appréhender ensuite les futures études *in vitro* et *in vivo* des propriétés inflammatoires des cristaux de pyrophosphate de calcium hydraté (CPP : $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) ou encore pourront aider à préciser le diagnostic des maladies à cristaux de CPP.

Ce chapitre présente les différentes caractérisations fines des phases synthétisées et décrites dans le Chapitre II, réalisées notamment sur grands instruments et équipements de laboratoire : diffraction des rayons X (DRX) sur synchrotron, diffraction des neutrons, spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide et infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) basse température ainsi que des observations réalisées au microscope électronique en transmission (MET) et par diffraction électronique. Ces caractérisations seront comparées à des simulations *ab initio* réalisées d'après la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) pour l'interprétation des résultats et validation des modèles théoriques. Certaines de ces caractérisations ont été réalisées en collaboration avec différents laboratoires : le Laboratoire Léon Brillouin pour la diffraction des neutrons, la ligne Cristal du Synchrotron SOLEIL pour la diffraction des rayons X, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris et de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier pour les études en RMN du solide, le Center for Advanced Scientific Computing and Modeling (CASCaM) - Materials Science and Engineering department à Denton (University of North Texas, USA) pour les simulations *ab initio*.

A. Analyses structurales des phases de pyrophosphate de calcium hydratées

Des analyses structurales ont été réalisées sur les différentes phases de CPP synthétisées suivant le protocole décrit dans le chapitre II. Les analyses préliminaires sur instruments de laboratoire ont démontré la pureté des échantillons mais les données recueillies n'ont pas permis la résolution complète des structures des CPP, notamment de la phase m-CPPD.

A1. Diffraction des rayons X et diffraction des neutrons

A1 a) Théorie de la diffraction des rayons X sur poudre

Afin d'espérer résoudre une structure par analyse des diagrammes de diffraction des rayons X sur poudre, il est nécessaire de comprendre les différents phénomènes affectant le profil obtenu. Ceux-ci peuvent être divisés en 4 catégories, chacune affectant le diagramme observé :

- les caractéristiques de l'instrument utilisé pendant la mesure : optique de l'appareil, résolution, configuration...
- les paramètres structuraux : paramètres de maille, positions atomiques, vibration thermique...
- les paramètres microstructuraux : taille de cristallites, micro-contraintes, défaut de cristallisation...
- les caractéristiques de l'échantillon : orientation préférentielle, absorbance, pureté, cristallinité...

Chacune de ces contributions sera analysée afin d'obtenir les outils nécessaires à la résolution structurales (Annexe C).

A1 b) Résolution structurale à partir de diagrammes de diffraction sur poudre

Les différents paramètres influençant les intensités observées sur un diagramme de diffraction ayant été identifiés, il est maintenant théoriquement possible de résoudre la structure cristalline à partir de ce diagramme. La détermination structurale à partir de diagramme de diffraction des rayons X ou des neutrons sur poudre repose ainsi sur plusieurs étapes dont les principales peuvent être regroupées en une acquisition optimale des données, une recherche des paramètres de maille et du groupe d'espace, l'obtention d'une structure modèle et l'affinement de cette structure.

Chacune de ces étapes fait appel à des méthodes et des critères différents afin de valider la solution obtenue (Annexe 4).

Le but combiné des approches expérimentales, d'analyse par diffraction des rayons X et des neutrons, et théorique au travers de la théorie de la fonctionnelle de la densité (Annexe 3) est de fournir une description précise et cohérente de la structure des phases étudiées. Des modèles théoriques *ab initio* pourront être ainsi développés à partir de ces structures afin d'étudier leurs propriétés, notamment inflammatoires dans le cas des pyrophosphates de calcium.

A2. Analyse des diagrammes de diffraction des rayons X des phases de pyrophosphate de calcium hydratées

Sur les trois principales phases cristallines de CPP synthétisées et étudiées dans le chapitre II, m-CPPD, t-CPPD et m-CPPT β , une seule possède une structure totalement résolue : la structure de la phase t-CPPD a ainsi été résolue à partir de données de DRX sur monocristal par Mandel en 1975 [Mandel, 1975], les hydrogènes ont pu être placés dans la structure par Fourier différence, sans contrainte sur les distances ou les angles.

De plus, la structure de la phase m-CPPT β a été résolue à partir de données de DRX sur monocristal par Balić-Žunić *et al.* [Balić-Žunić *et al.*, 2000]. La qualité du cristal, notamment de part sa taille, n'ont pas permis le placement des atomes d'hydrogène dans une structure pourtant fortement orientée du fait de la présence de liaisons hydrogène. L'absence d'information sur les positions des atomes d'hydrogène empêche par exemple l'étude de la déshydratation à haute température et de l'hydrolyse de la molécule de pyrophosphate associée [Gras *et al.*, 2013a; b].

Concernant la phase m-CPPD, peu de données cristallographiques sont disponibles. Depuis sa première identification au sein d'articulations de patients arthritiques par Kohn *et al.*, cinq diagrammes de DRX de cette phase ont été publiés, à partir de données sur échantillons synthétiques [Brown *et al.*, 1963; Mandel *et al.*, 1988] ou *ex vivo* [Kohn *et al.*, 1962; Swan *et al.*, 1995] ou en comparant les deux [Liu *et al.*, 2009]. Le système cristallin monoclinique fut déterminé par Brown *et al.*, donnant lieu à la notation m-CPPD mise en place par Mandel *et al.* [Brown *et al.*, 1963; Mandel *et al.*, 1988]. Une seule tentative d'indexation fut réalisée par Mandel *et al.* sur un échantillon réduit de réflexions [Mandel *et al.*, 1988]. Une description structurale complète de cette phase pathologique pourrait cependant nettement améliorer la compréhension de son potentiel inflammatoire, le plus élevé parmi les phases de CPP [Roch-Arveiller *et al.*, 1990].

D'autres structures d'intérêt pour notre étude ont été publiées notamment celles des

pyrophosphates de calcium anhydres α - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ et β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ et du hexakis-pyrophosphate de decacalcium tetrapotassium nonahydraté $\text{Ca}_{10}\text{K}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_6 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ par Mathew *et al.* [Webb, 1966; Calvo, 1968; Mathew & Ammon, 1995]. Ces phases, proches des pyrophosphates de calcium d'intérêt biologique, représentent des phases modèles pour certains processus liés à la formation ou à l'évolution des phases de CPP, tels que la déshydratation ou la précipitation en présence d'une forte concentration en cations monovalents.

Il reste ainsi de nombreuses interrogations sur les structures de pyrophosphates de calcium hydratés que nous tenterons de résoudre dans cette partie. En raison des difficultés rencontrées pour obtenir des monocristaux de qualité suffisante pour une détermination structurale sur monocristal, les résolutions de structure ont été principalement réalisées à partir de données acquises par diffraction des rayons X sur poudres.

A2 a) Résolution de la structure de la phase m-CPPD

La structure de la phase m-CPPD, dont les cristaux sont parfois rencontrés dans les articulations de patients arthritiques, reste à ce jour non publiée. Nous avons déjà pu évoquer la difficulté de synthétiser un échantillon pur de cette phase pour rendre cette résolution de structure plus aisée. Néanmoins, le protocole de synthèse décrit dans le chapitre II a permis d'obtenir une quantité importante de cristaux de m-CPPD et les caractérisations effectuées par la suite ont démontré la pureté de ces échantillons. Cette partie détaillera l'analyse du diagramme de diffraction des rayons X sur synchrotron effectué sur l'un de ces échantillons de m-CPPD synthétisés afin de résoudre la structure de cette phase.

(1) Recherche des paramètres de maille

Les résultats de cette étape ont été partiellement présentés après affinement dans le chapitre II, à partir du diagramme obtenu avec le diffractomètre D8 Advance. Les données présentées ici sont réalisées à partir du diagramme obtenu sur la ligne Cristal du synchrotron Soleil. Les logiciels DicVol06 et TOPAS ont été utilisés pour déterminer les paramètres de maille de la phase m-CPPD.

Tous deux présentent une solution équivalente, soit un système monoclinique dont les paramètres de maille sont décrits dans le tableau III-1.

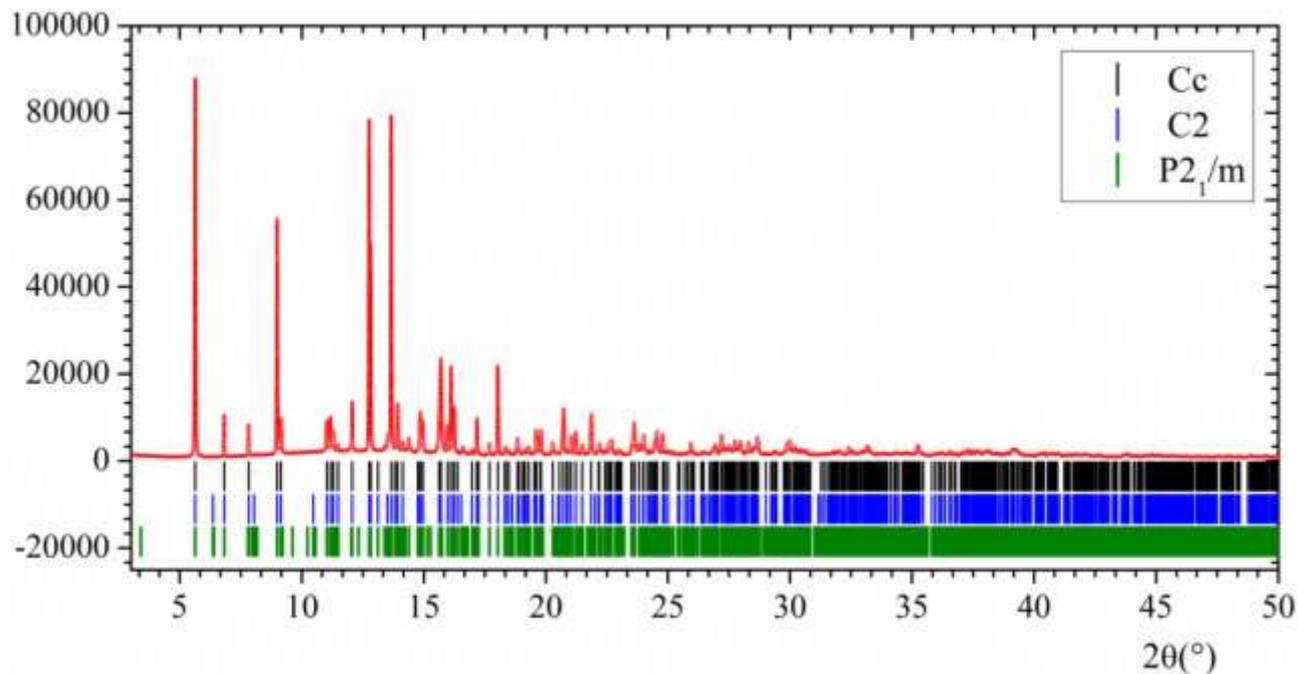
Tableau III-1 : Paramètres de maille proposés par les logiciels TOPAS et DicVol06 et figures de mérite associées à la phase m-CPPD [Coelho, 2003; Boulouf & Louër, 2004]

Logiciel.	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	M(N)	F(N)
m-CPPD TOPAS	12,6124	9,2469	6,7520	90,00	104,990	90,00	164	
DicVol	12,6088	9,2432	6,7493	90,00	104,994	90,00	173	614

Le groupe d'espace proposé pour la structure varie cependant suivant le logiciel utilisé et une analyse non automatique a été réalisée. Le logiciel Jana2006 propose en priorité les groupes de basse symétrie Pm, P2, P2/m et P2₁/m tandis que le logiciel TOPAS propose les groupes d'espace Cc et C2. Les groupes Cc et C2 ne décrivent pas complètement les réflexions observées sur le diagramme (figure III-5). Tandis que les groupes d'espace Pm, P2, P2/m et P2₁/m présentent à l'inverse de nombreux pics de Bragg ne correspondant à aucune intensité sur le diagramme. La résolution complète de structure à partir de ces groupes d'espace n'a pas permis d'aboutir à une structure cohérente.

Nous nous sommes donc orientés vers des méthodes complémentaires pour définir le groupe d'espace, notamment par comparaison avec des structures de formule chimique proche et par regroupement de technique de détermination du groupe d'espace.

a) Intensité



b) Intensité

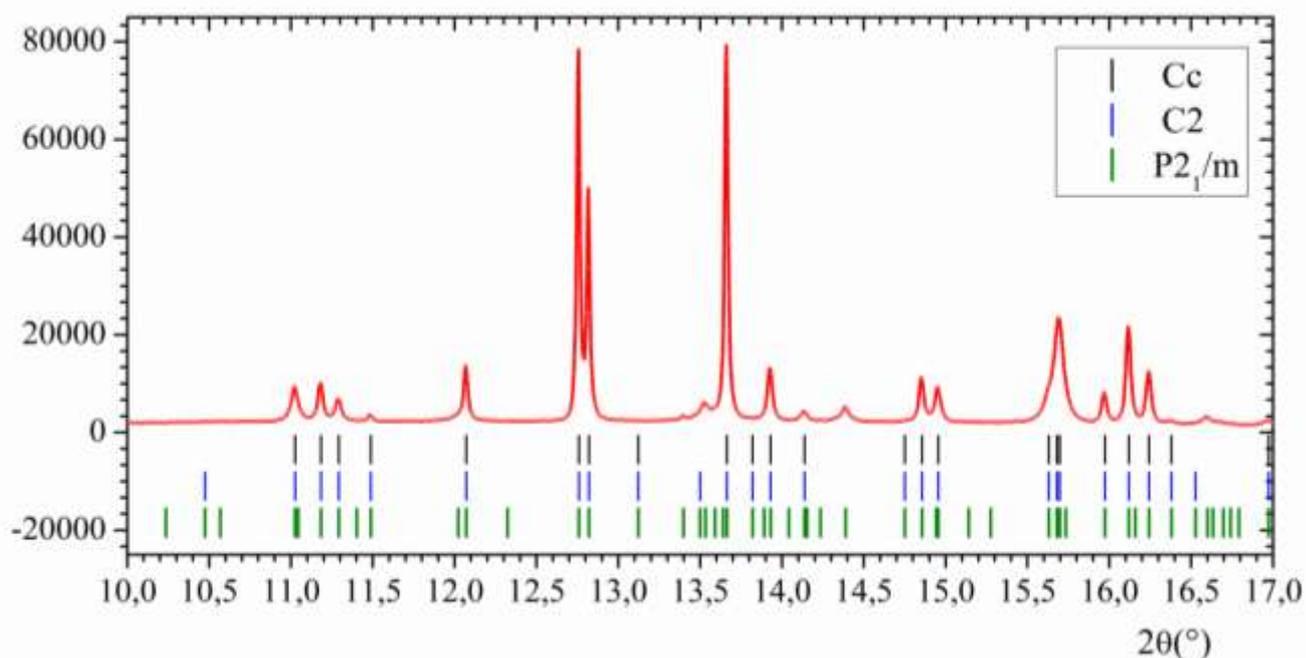


Figure III-1 : Correspondance entre le diagramme de diffraction des RX de la phase m-CPPD synthétisée obtenu sur la ligne Cristal du synchrotron SOLEIL et les groupes d'espaces proposés par les logiciels Jana2006 ($P2_1/m$) et TOPAS (Cc et C2).
 a) diagramme complet de 3° à 50°, b) agrandissement montrant les pics non indexés

Une recherche bibliographique sur les composés de pyrophosphate dihydratés, autre que des sels de calcium, montre que plusieurs composés possèdent des structures semblables les unes aux autres : $Mg_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ [Oka & Kawahara, 1982], $Co_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ [Effenberger & Pertlik, 1993], $Fe_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ [Giesber III *et al.*, 2000] et $Mn_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ [Schneider & Collin, 1973] possèdent des structures monocliniques dont les paramètres de maille et les positions atomiques sont très proches

(tableau III-2 et figure III-6).

Tableau III-2 : Paramètres de maille des composés $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Oka & Kawahara, 1982], $\text{Co}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Effenberger & Pertlik, 1993], $\text{Fe}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Giesber III *et al.*, 2000] et $\text{Mn}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Schneider & Collin, 1973]. Les rayons atomiques sont donnés à titre indicatif [Shannon & Prewitt, 1969; Shannon, 1976].

		a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V (Å ³)	r (Å)
$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	P2 ₁ /n	6,277(1)	13,906(2)	7,367(1)	90,00	94,37(2)	90,00	641,2	0,86
$\text{Co}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	P2 ₁ /n	6,334(1)	13,997(3)	7,376(1)	90,00	94,77(3)	90,00	651,7	0,89
$\text{Fe}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	P2 ₁ /n	6,400(2)	14,181(3)	7,416(1)	90,00	95,43(2)	90,00	670,1	0,92
$\text{Mn}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	P2 ₁ /n	6,461(2)	14,325(4)	7,570(4)	90,00	95,20(4)	90,00	674,7	0,97

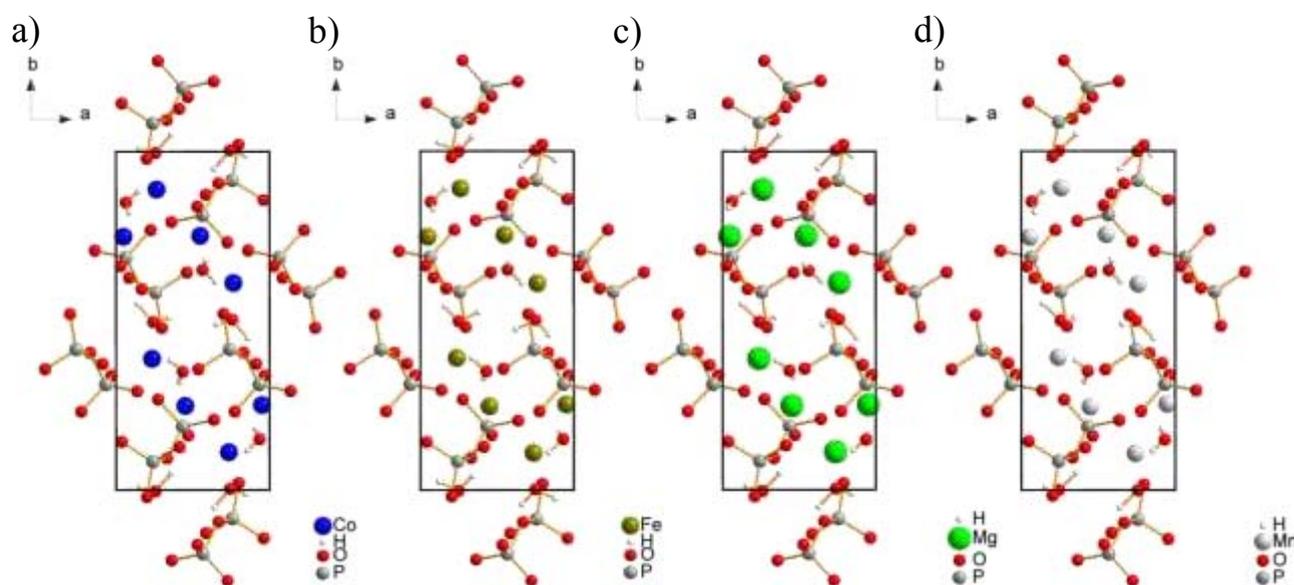


Figure III-2 Structures des phases a) $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Oka & Kawahara, 1982], b) $\text{Co}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Effenberger & Pertlik, 1993], c) $\text{Fe}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Giesber III *et al.*, 2000] et d) $\text{Mn}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Schneider & Collin, 1973].

Ces paramètres de maille sont trop éloignés des paramètres obtenus pour la phase m-CPPD pour que cette dernière puisse être considérée appartenir au même ensemble. Le volume de la maille de la phase m-CPPD (759,3 Å³) est de plus bien supérieur à ceux des autres composés de pyrophosphate dihydratés. Cependant après analyse des résultats proposés, le groupe d'espace P2₁/n a finalement été retenu pour la phase m-CPPD. Ce groupe figure en troisième position dans les solutions fournies par le logiciel TOPAS et en cinquième position dans la liste donnée par le logiciel Jana2006. Il représente ainsi la première solution commune devant le groupe d'espace P2₁/m. Le groupe P2₁/n correspond à celui de nombreux sels dihydratés de pyrophosphate ; il est également le groupe le plus courant dans les bases de données structurales.

Remarquons que l'augmentation du nombre de réflexions examinées a toujours fourni les mêmes solutions : le pic de Bragg à $14,38^\circ$ étant exclu de la solution dans TOPAS, au profit de la statistique, et pris en compte dans Jana2006.

(2) *Décomposition du profil.*

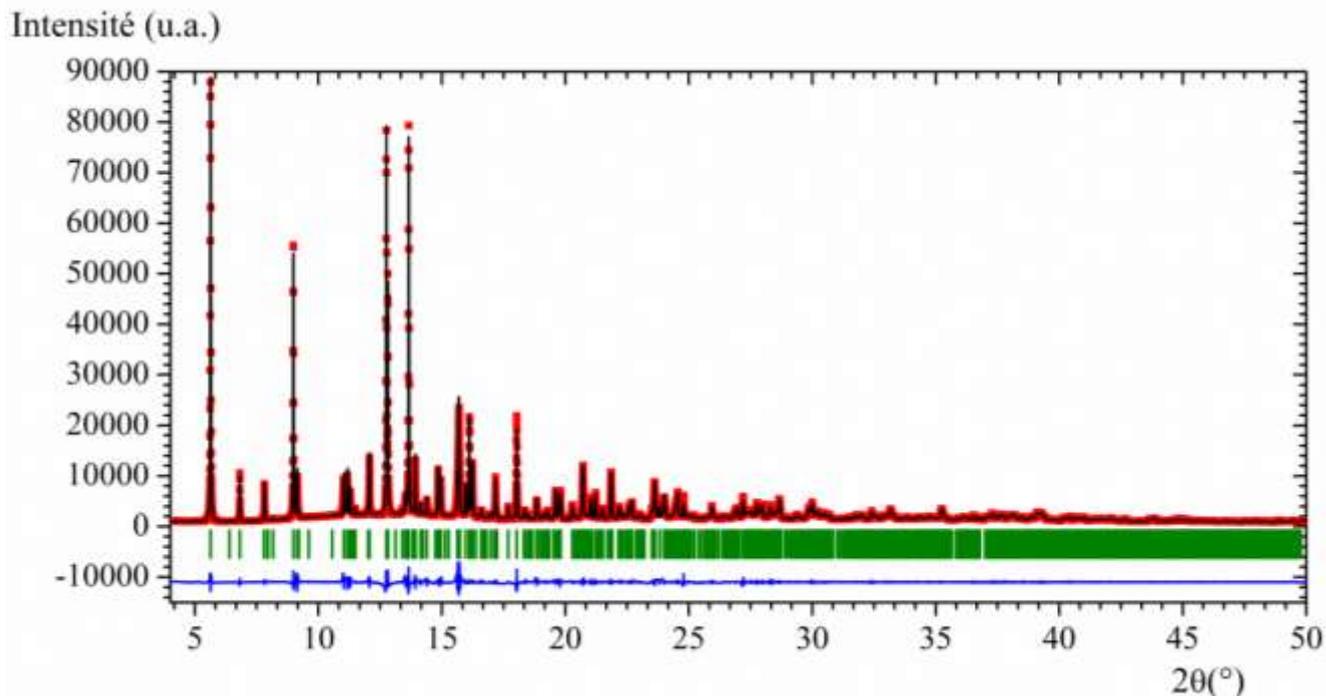
La modélisation du profil a été réalisée par une fonction pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings, isotrope dans un premier temps. Les détails de l'affinement ont été donnés dans l'annexe 4. Les résultats de l'affinement sont reportés dans le tableau III-3.

Tableau III-3 : Données de l'affinement du diagramme de RX de la phase m-CPPD par la méthode de Le Bail.

m-CPPD (Le Bail)	
Système cristallin, Groupe d'espace	Monoclinique, $P2_1/n$
Température (K)	293
a, b, c (Å)	12,60925 (6) ; 9,24285 (5) ; 6,74922 (3)
β (°)	104,9952 (6)
V (Å ³)	759,81 (1)
Z	4
Radiation	Rayon X Synchrotron, $\lambda = 0,72442$ Å
Diffractomètre	2-cercles Cristal, Soleil
Porte échantillon	Capillaire 0,7 mm
2θ (°)	$2\theta_{\min} = 3,00$ $2\theta_{\max} = 49,99$ $2\theta_{\text{step}} = 0,004$
Affinement	
Facteurs d'accord de profil (%)	$R_p = 4,56$; $R_{wp} = 6,97$; $R_{\text{exp}} = 3,81$; $\chi^2 = 3,34$
No, de point de mesure	12498
No, de réflexion	1332
No, de paramètre affiné	16
No, of contrainte	0
$(\Delta/\sigma)_{\max}$	7,115
Fonction utilisée	Pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings isotrope
Paramètres d'affinement	
U, V, W	0,3025(13) ; -0,0531(8) ; 0,0021(1)
X, Y	0,0201(1) ; 0,0158(22)
Z	0,0024(1)
Orientation préférentielle	
$G1$ (001)	0,9723(12)

Les facteurs d'accord obtenus sont encourageants en ce qui concerne la possibilité d'obtenir une structure vraisemblable à partir du diagramme étudié en se basant sur un groupe d'espace $P2_1/n$. L'observation du profil montre cependant que certains pics présentent des élargissements pouvant provenir d'une anisotropie de taille ou/et de déformation (figure III-3).

a)



b)

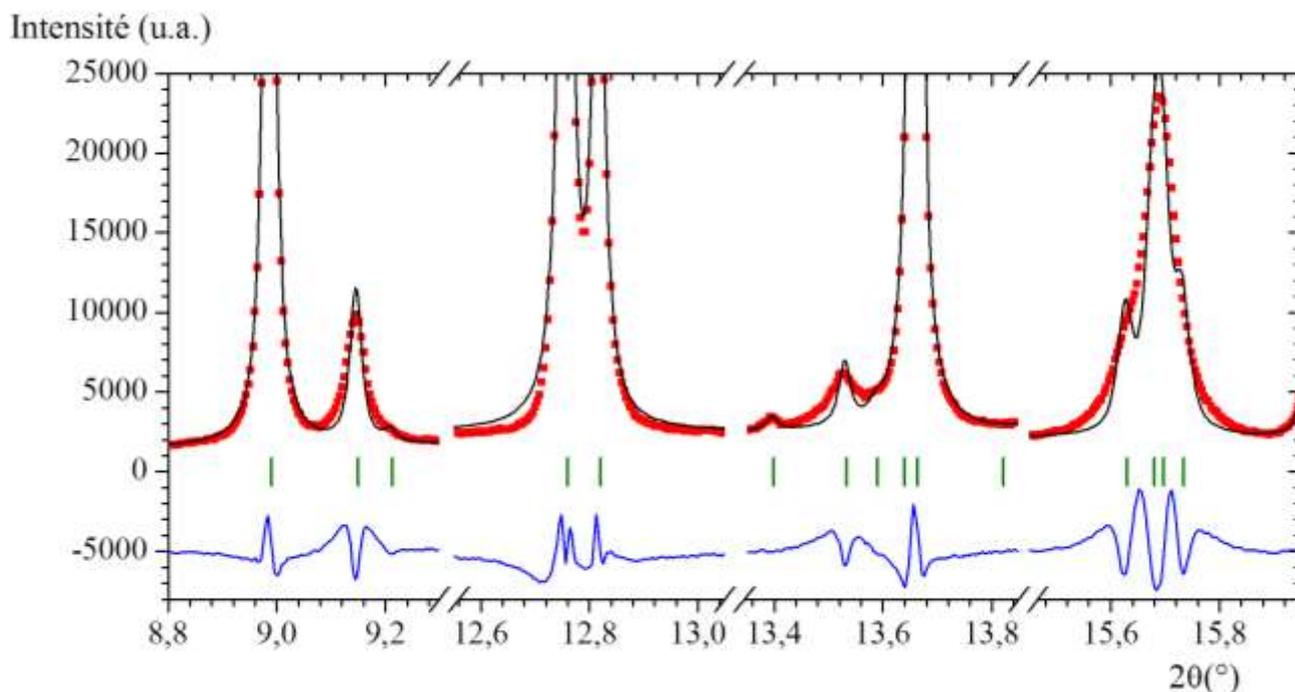


Figure III-3 : Diagramme Le Bail de la phase m-CPPD par diffraction des rayons X synchrotron. Les données acquises sont représentées par des points rouges, le profil simulé par une ligne noire et la différence par une ligne bleue. Les barres verticales indiquent les positions des pics de Bragg. a) Diagramme complet, b) agrandissement sur certains pics présentant une asymétrie.

Les relations entre les pics de Bragg correspondant à ces réflexions ne permettant pas de définir un axe privilégié, la fonction pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings paramétrée anisotrope a été utilisée par la suite pour modéliser ces contributions. De plus, l'analyse met en évidence une orientation préférentielle faible suivant l'axe (001) compatible avec la forme aciculaire des cristaux observés au microscope électronique à balayage.

(3) Détermination du modèle structural.

Le modèle structural a été déterminé dans un premier temps par le programme Superflip, sur la base des données de l'affinement fournies par la méthode Le Bail implémentée dans Jana2006. Cet affinement est réalisé avec des fonctions isotropes. La solution proposée contient alors les deux ions calcium, les deux atomes de phosphore et les sept atomes d'oxygène. Les atomes d'oxygène et d'hydrogène manquant ont pu être placés manuellement sur la carte de Fourier-Différence (figure III-4). La carte de Fourier indique clairement la position des atomes dans la maille, la carte Fourier différence présentant un écart maximum à $0,62 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$.

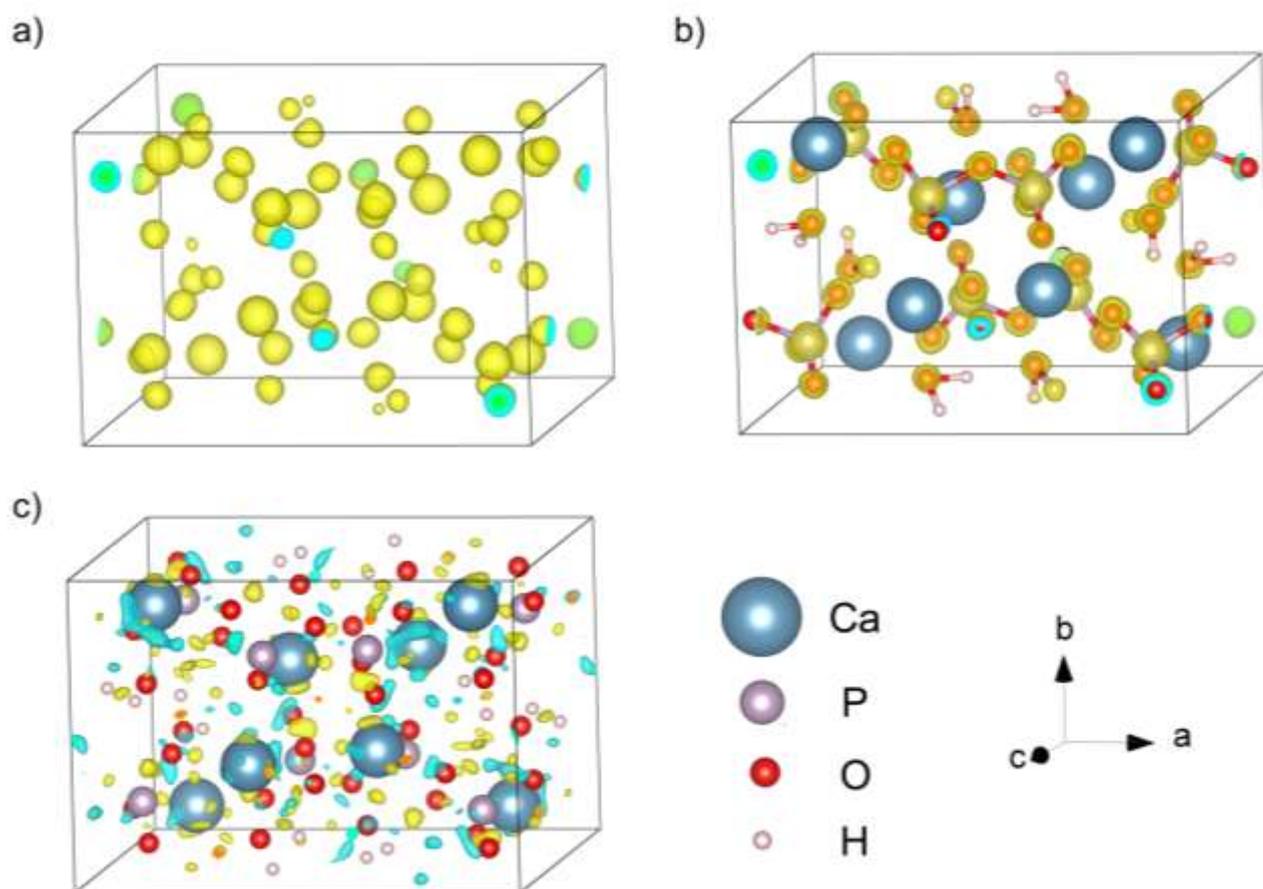


Figure III-4 : Carte de Fourier 3D et modèle structural de la phase m-CPPD : a) Isopotentiels de la carte de Fourier 3D (établie à $6,5 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$), b) modèle structural proposé superposé aux isopotentiels et c) isopotentiels de la carte Fourier-différence avec un seuil à $0,40 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$. Les cartes ont été obtenues *via* le logiciel VESTA [Momma & Izumi, 2011].

Les molécules de pyrophosphate et les molécules d'eau sont bien identifiables. Ce modèle a donc été jugé suffisamment proche de la solution finale pour être utilisé comme base pour l'affinement de Rietveld final.

(4) Affinement par la méthode de Rietveld

Le modèle structural a ensuite été affiné en utilisant la méthode de Rietveld afin d'obtenir la structure la plus réaliste. L'affinement a été réalisé avec le logiciel FullProf, en utilisant une fonction III-12 |

pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings paramétrée anisotrope [Rodríguez-Carvajal, 2001]. Les résultats de l'affinement Rietveld sont compilés dans le tableau III-4 et les coordonnées atomiques sont indiquées dans le tableau III-5.

Les facteurs d'accord de profil indiquent que l'affinement du profil reste de bonne qualité. Le facteur de Bragg, à 9,52%, indique quand à lui que la structure est vraisemblable et de bonne qualité sans toutefois être optimisée. Des améliorations pourront surement être apportées par une analyse plus poussée.

Les paramètres V, W et X sont notamment particulièrement bas, de l'ordre des contributions instrumentales (respectivement -0,000093, 0,000021 et 0,001540). Ces indices confirment la qualité de l'affinement.

Tableau III-4 : Données de l'affinement par la méthode de Rietveld du diagramme de diffraction des RX du m-CPPD synthétisé.

m-CPPD (Rietveld)	
Système cristallin, Groupe d'espace	Monoclinique, $P2_1/n$
Température (K)	293
a, b, c (Å)	12,60831(5), 9,24257(4), 6,74882(2)
β (°)	104,99267(9)
V (Å ³)	759,69 (1)
Z	4
Radiation	Rayon X Synchrotron, $\lambda = 0,72442$ Å
Diffractomètre	2-cercles Cristal, Soleil
Porte échantillon	Capillaire 0,7 mm
2θ (°)	$2\theta_{\min} = 3,00$ $2\theta_{\max} = 49,99$ $2\theta_{\text{step}} = 0,004$

m-CPPD (Rietveld)

Affinement

Facteurs d'accord de profil (%) $R_p = 5,24$; $R_{wp} = 6,81$; $R_{exp} = 3,76$; $\chi^2 = 3,28$
 Facteurs d'accord de structure (%) $R_{Bragg} = 9,52$; $R_F = 14,29$

No, de point de mesure	12498
No, de réflexion	1332
No, de paramètre affiné	96
No, de contrainte	4
Affinement des H	Mixte contraint et indépendant $d_{O-H} = 0,9 \pm 0,2 \text{ \AA}$
Fonction utilisée	Pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings anisotrope
Paramètres d'affinement	
<i>U, V, W</i>	0,0178 (408) ; -0,0004 (3) ; 0,0001(1)
<i>X, Y</i>	0,0077(24) ; 0,0114(16)
<i>Z</i>	0,0008 (1)
Orientation préférentielle	
<i>G1 (001)</i>	0,9818(26)
Harmoniques sphériques	
<i>Y₀₀, Y₂₂₊, Y₂₂₋</i>	0,549(3) ; 0,091(6) ; 0,209(8)
<i>Y₂₀, Y₄₄₊, Y₄₄₋</i>	0,173(10) ; -0,264(9) ; 0,221(10)
<i>Y₄₂₊, Y₄₂₋, Y₄₀</i>	0,067(10) ; -0,123(10) ; -0,069(7)
Déformation anisotrope	
<i>S₄₀₀, S₀₄₀, S₀₀₄</i>	-0,002(1) ; 0,002(1) ; 0,008(3)
<i>S₂₂₀, S₂₀₂, S₀₂₂</i>	0,195(4) ; 0,036(8) ; 1,120(27)
<i>S₁₂₁, S₃₀₁, S₁₀₃</i>	0,914(21) ; -0,019(7) ; 0,069(8)

Tableau III-5 : Coordonnées atomiques et déplacements quadratiques moyens isotropes (\AA^2) du m-CPPD.

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U_{iso}^*/U_{eq}
Ca1	0,6437(2)	0,6236(5)	0,2137(4)	0,0248(11)
Ca2	0,3768(2)	0,6211(5)	0,3298(4)	0,0382(13)
H1	0,372(9)	0,971(12)	0,327(18)	0,063*
H2	0,423(10)	0,847(17)	0,202(17)	0,063*
H3	0,100(9)	0,531(17)	0,672(17)	0,063*
H4	0,142(5)	0,624(7)	0,902(11)	0,063*
O1	0,6384(6)	0,3789(11)	0,3302(10)	0,014(2)
O2	0,5698(5)	0,6394(10)	0,5193(10)	0,006(2)
O3	0,5435(6)	0,3503(9)	0,9506(10)	0,025(3)
O4	0,1670(6)	0,3521(11)	0,6627(11)	0,023(3)
O5	0,1964(5)	0,6587(9)	0,1959(10)	0,001(2)
O6	0,3372(7)	0,3888(10)	0,1287(11)	0,044(3)
O7	-0,0172(7)	0,3009(5)	0,7140(12)	0,0190(19)
OW1	0,9028(5)	0,6277(14)	0,8292(13)	0,044(3)
OW2	0,1224(6)	0,6227(15)	0,7517(12)	0,044(3)
P1	0,3859(4)	0,2726(7)	0,2889(6)	0,0402(16)
P2	0,0929(4)	0,2217(6)	0,6628(6)	0,0354(14)

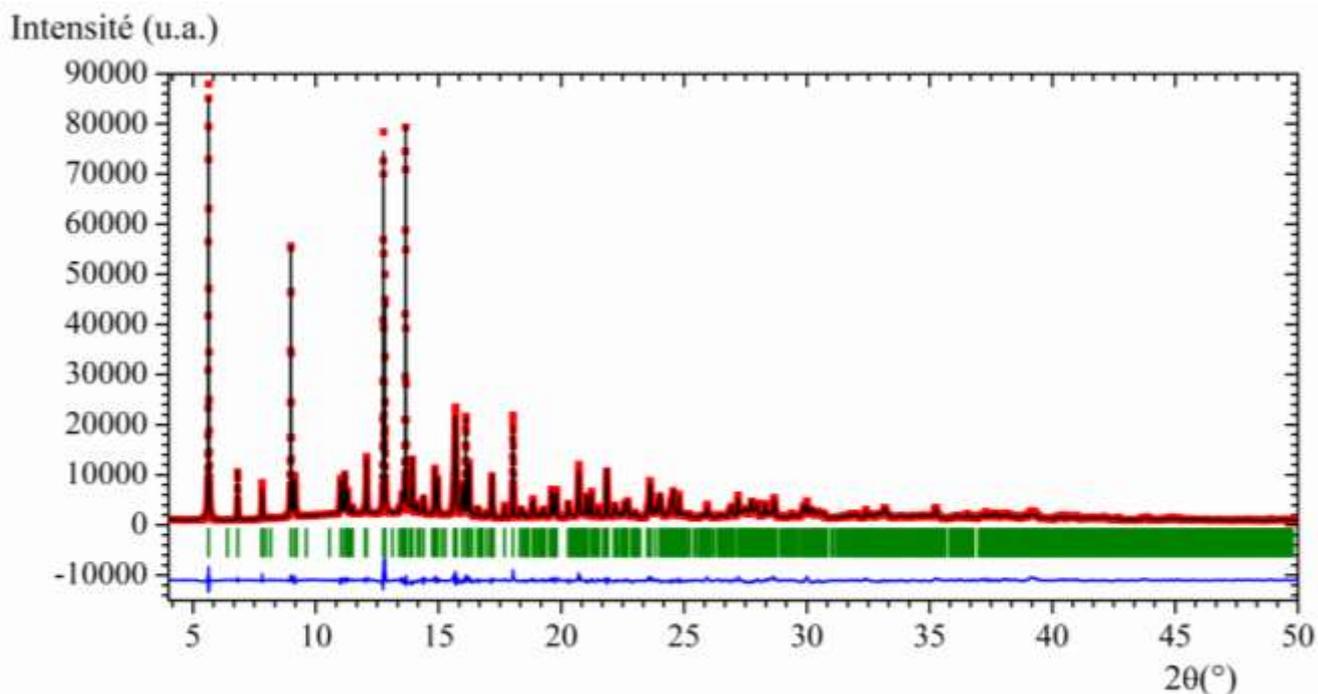
* Les déplacements quadratiques moyens des atomes d'hydrogène sont fixés pour correspondre à ceux de la structure t-CPPD [Mandel, 1975].

(5) *Analyse de la solution proposée*

Analyse du diagramme

L'apport des éléments anisotropes a été notable sur la modélisation du profil afin de correspondre au plus près au diagramme observé, la forme des cristaux étant aciculaire. Les réflexions identifiées comme comportant un caractère anisotrope ont été mieux affinées avec les paramètres utilisés lors de cette étape. La figure III-5 indique ainsi les améliorations apportées par ces contributions sur l'ensemble du diagramme de DRX.

a)



b)

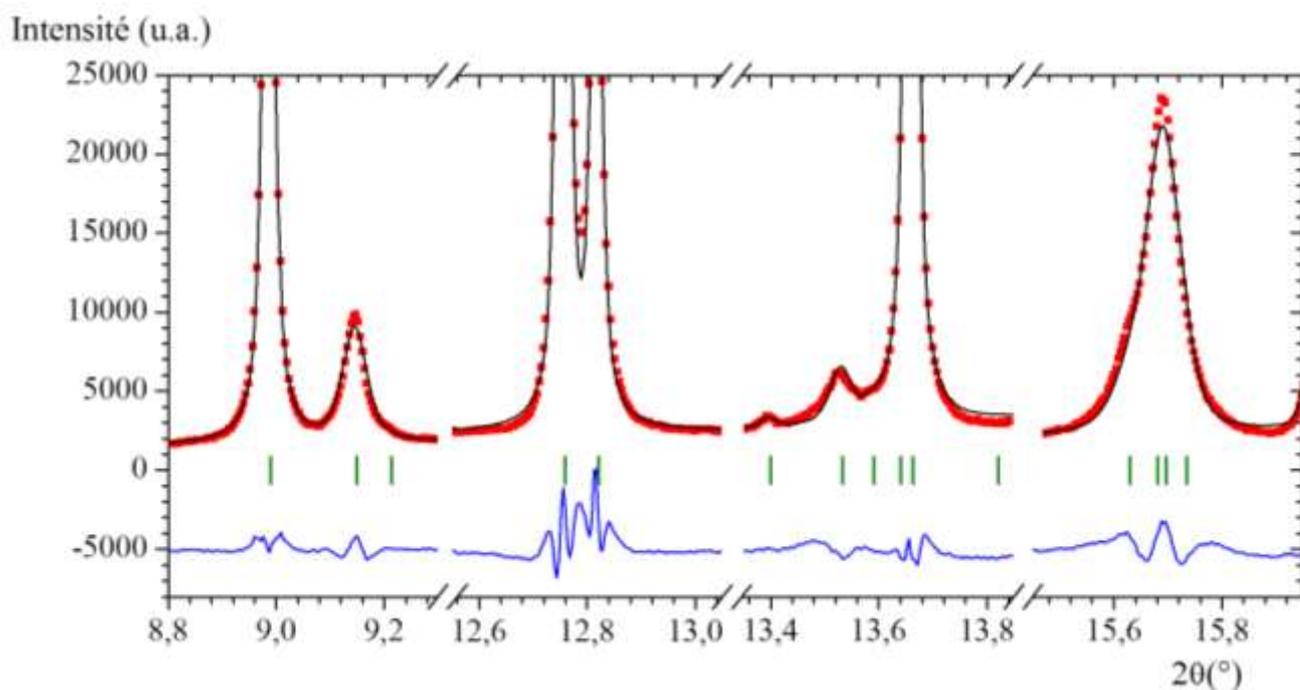


Figure III-5 : Diagramme Rietveld de la phase m-CPPD analysée par diffraction des rayons X synchrotron. Les données acquises sont représentées par des points rouges, le profil simulé par une ligne noire et la différence par une ligne bleue. Les barres verticales indiquent les positions des pics de Bragg. a) Diagramme complet, b) agrandissement sur certains pics présentant une asymétrie

Analyse de la structure de la phase m-CPPD

La structure de la phase m-CPPD présente clairement des groupements correspondant à la molécule de pyrophosphate et aux deux molécules d'eau pour un volume total de $759,69 \text{ \AA}^3$. Chaque

unité $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ est répétée quatre fois par maille, pour un volume par unité formulaireire de $189,92 \text{ \AA}^3$, de 13% à 18% plus important que les autres composés de pyrophosphate de calcium. Ce volume est aussi sensiblement égal à deux fois le volume de la maille de la structure t-CPPD, soit $757,27 \text{ \AA}^3$ pour un volume par unité formulaireire de $189,32 \text{ \AA}^3$.

Les molécules de pyrophosphates sont organisées sur les plans (010) avec une alternance dans l'orientation de ces molécules par rapport à l'axe \vec{c} due au centre d'inversion (figure III-6). La cohésion du cristal suivant l'axe \vec{b} semble assurée par une alternance de liaisons de coordination et de liaisons hydrogène.

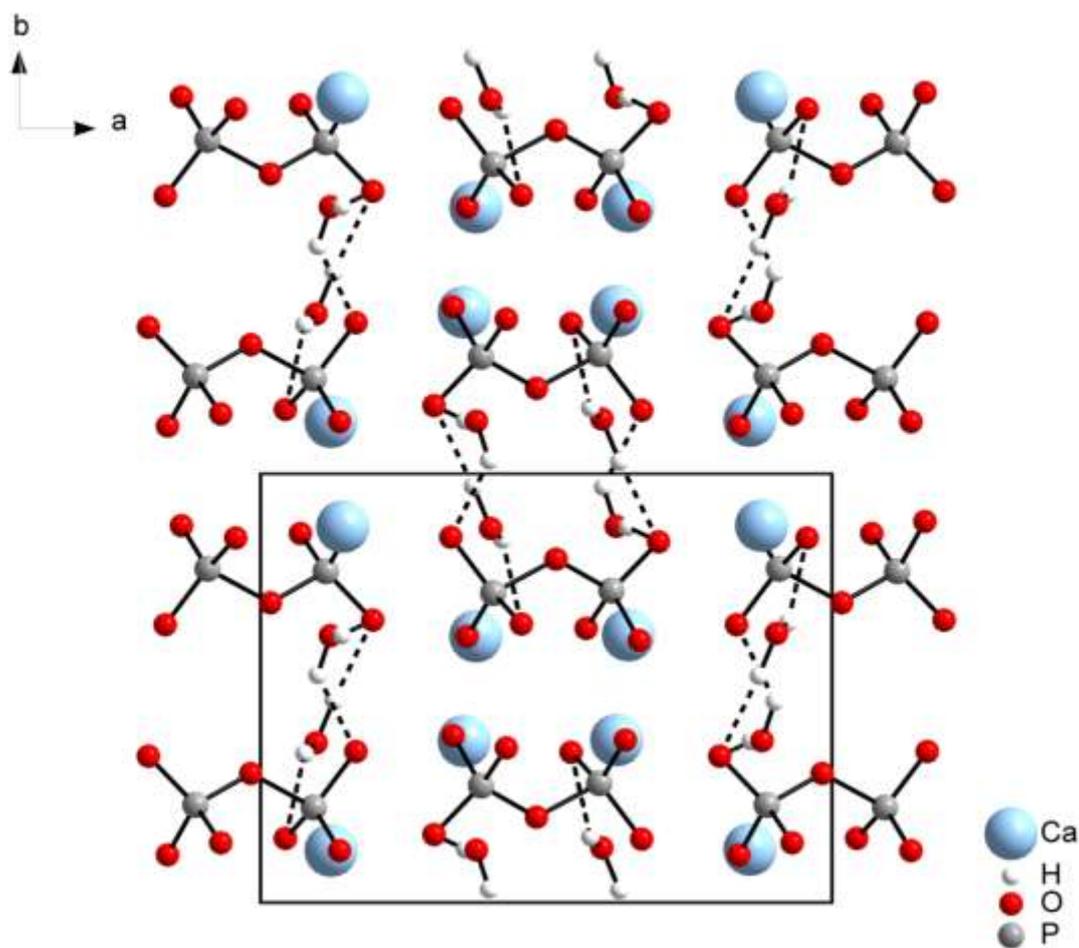


Figure III-6 : Structure de la phase m-CPPD suivant l'axe [001] avec représentation des molécules de pyrophosphate organisées sur le plan (010) et les liaisons hydrogène, en tirets.

Cette organisation est proche de celle observée dans la structure de la phase t-CPPD résolue par Mandel. En projetant cette structure suivant l'axe \vec{c} , une alternance dans les orientations des molécules de pyrophosphate et un réseau compact de molécules d'eau liées au groupement terminaux des molécules de pyrophosphate par des liaisons hydrogène sont observés. Les différences principales entre la structure de t-CPPD et celle de m-CPPD peuvent être décrites comme une translation d'une unité formulaireire représentant un quart de la maille par rapport à l'autre suivant l'axe $[1\bar{1}0]$, résultant

d'un enchainement plus compact des pyrophosphates sur l'axe [001] situé à l'origine de la maille, et un réseau de liaisons hydrogène modifié pouvant expliquer le volume plus faible observé pour la structure t-CPPD (figure III-7).

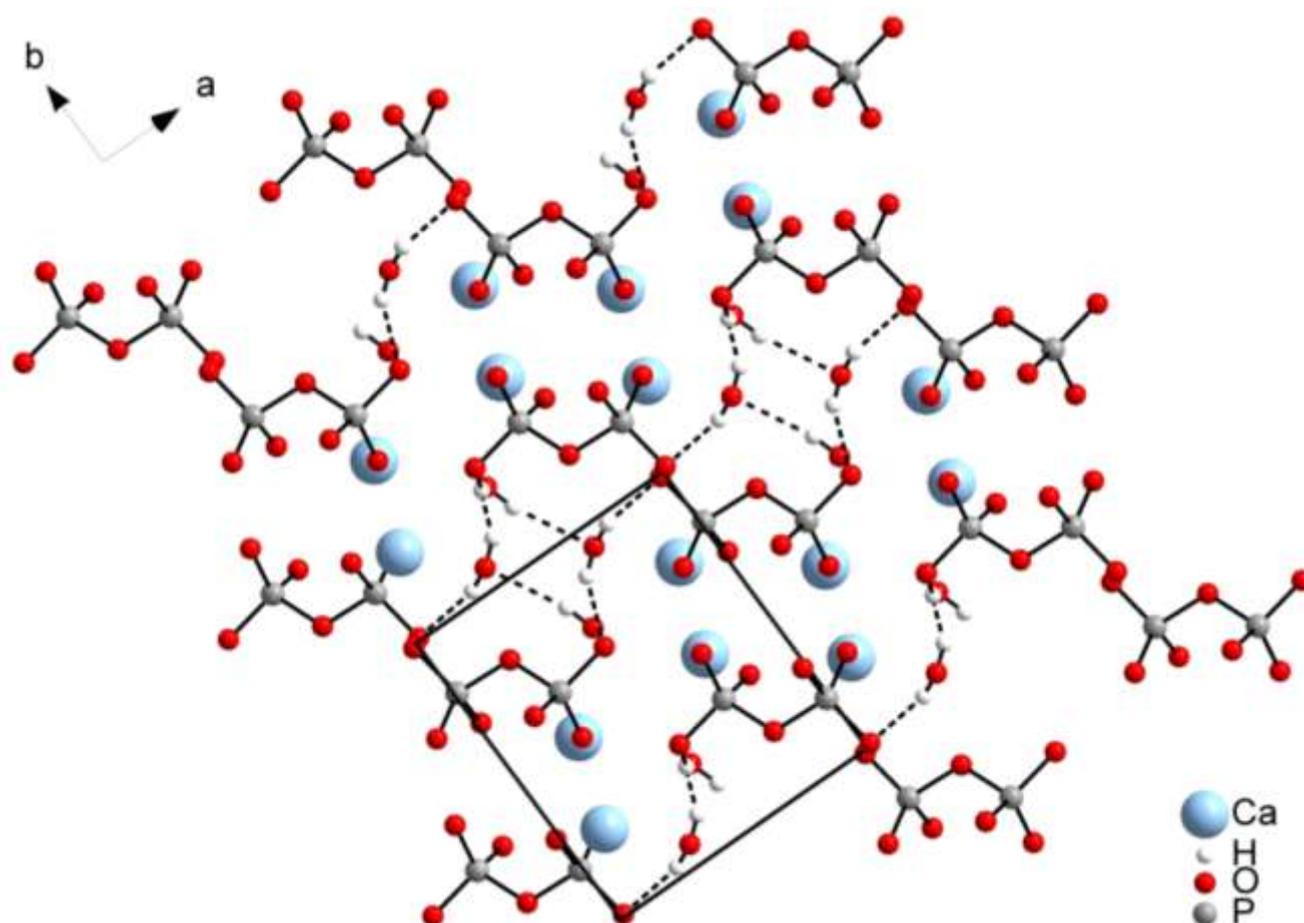


Figure III-7 : Structure de la phase t-CPPD suivant l'axe [001] avec représentation des molécules de pyrophosphate organisées suivant le plan (110) et les liaisons hydrogène, en pointillé.

Remarquons que les axes \vec{c} utilisés pour ces projections correspondent aux longueurs des différents cristaux aciculaires des phases m-CPPD et t-CPPD, déterminées par l'orientation préférentielle pour le m-CPPD et lors de la résolution de la structure cristalline sur monocristal par Mandel pour le t-CPPD [Mandel, 1975].

Pour finir, bien que proche de la structure de t-CPPD, la structure de m-CPPD est similaire dans son organisation moléculaire aux autres composés de pyrophosphates dihydratés : $Mg_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ [Oka & Kawahara, 1982], $Co_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ [Effenberger & Pertlik, 1993], $Fe_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ [Giesber III *et al.*, 2000] et $Mn_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ [Schneider & Collin, 1973]. On constate dans ces structures une organisation des molécules de pyrophosphate suivant une alternance d'orientations lorsque la structure est observée suivant l'axe [100]. L'unité formulaire $X_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ est reproduite sur deux plans orthogonaux avec une orientation variant de 180° puis 90° d'une unité à l'autre (figure III-8). L'axe [100] est là encore le grand axe des cristaux étudiés pour la résolution de structure dans deux cas sur III-18 |

quatre [Schneider & Collin, 1973; Giesber III *et al.*, 2000].

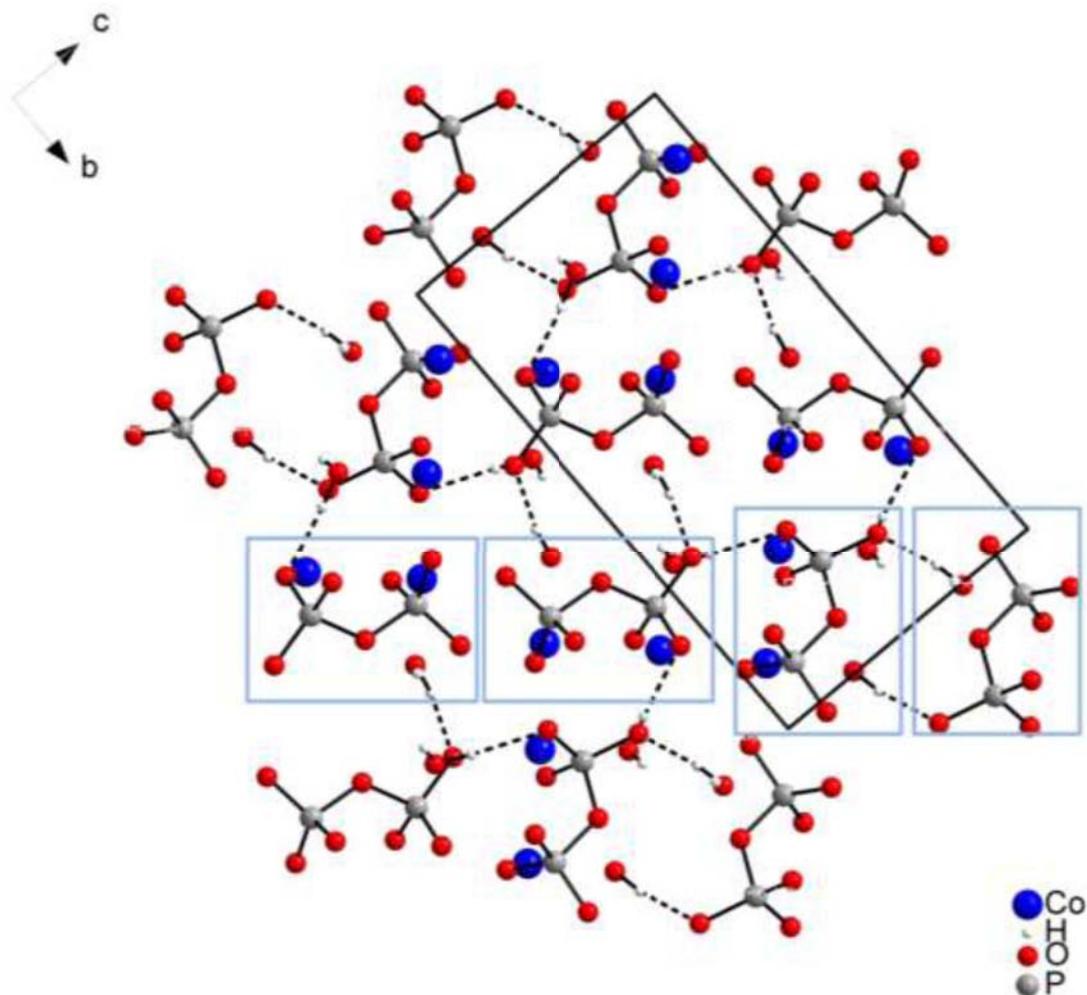


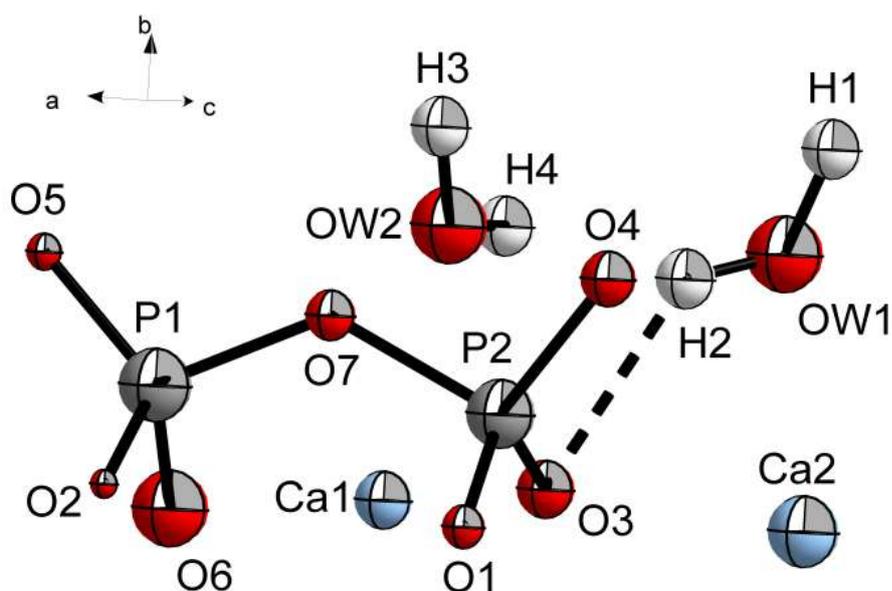
Figure III-8 : Structure de la phase $\text{Co}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ suivant l'axe [100] avec représentation des molécules de pyrophosphate organisées suivant deux plans orthogonaux.

Bien que les paramètres cristallographiques soient différents, ces similitudes avec des phases déjà décrites confortent la structure proposée pour la phase d'intérêt biologique m-CPPD.

Analyse des configurations moléculaires dans la phase m-CPPD

Les distances et configurations des différentes molécules et ensembles de coordination obtenues après affinement de Rietveld et présentées dans le tableau III-6 et sur la figure III-9 semblent être cohérentes avec les environnements des ions calcium et pour les deux types de molécules, avec cependant une légère déformation du groupement porté par l'atome P2 sur la molécule de pyrophosphate. Les distances P2-O1 de 1,46(1) Å et P2-O7 de 1,68(1) Å sont sensiblement différentes des valeurs attendues pour ce type de liaison, respectivement 1,50 Å et 1,62 Å. L'angle P1-O7-P2 de 128,4(6)° est cependant proche de la valeur estimée par analyse des spectres FTIR soit 126°. Les torsions sont plus faibles entre les groupements terminaux, correspondant aux structures de type dichromate [Davis *et al.*, 1985].

Les distances au sein des molécules d'eau ont été restreintes pour éviter que les atomes d'hydrogène ne s'éloignent des atomes d'oxygène associés lors de l'affinement. Cela conduit à des molécules d'eau avec des angles H-O-H de $123(9)^\circ$ et $114(10)^\circ$ c'est à dire légèrement plus ouverts que dans les autres structures observées pour les composés de pyrophosphate hydratés (de 95° à 115°) et des distances OW-H proches de 1 Å. La résolution de l'acquisition et le facteur de Bragg conduisent cependant à prendre les valeurs des positions des atomes d'hydrogène avec prudence.



FigureIII-9 : Configuration de l'unité formulaire $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Les ellipsoïdes sont représentés à 50% de probabilité.

Tableau III-6 : Paramètres géométriques sélectionnés (distances en Å et angles et torsions en °)

P1 — O5	1,500(10)	Ca1 — O4	2,326(8)
P1 — O2	1,508(9)	Ca1 — O3	2,346(7)
P1 — O6	1,535(10)	Ca1 — OW2	2,382(15)
P1 — O7	1,590(10)	Ca1 — O6	2,387(9)
		Ca1 — O1	2,401(11)
		Ca1 — O2	2,477(8)
P2 — O1	1,461(9)		
P2 — O4	1,525(11)	Ca2 — O5	2,247(6)
P2 — O3	1,556(8)	Ca2 — OW1	2,345(13)
P2 — O7	1,682(10)	Ca2 — O1	2,352(8)
		Ca2 — O3	2,376(8)
OW1 — H2	0,99(13)	Ca2 — O2	2,445(6)
OW1 — H1	0,99(11)	Ca2 — O6	2,520(10)
		Ca2 — O2	2,633(10)
OW2 — H4	0,98(11)		
OW2 — H3	1,00(14)		
<hr/>			
O5 — P1 — O2	115,4(5)	O1 — P2 — O4	112,7(6)
O5 — P1 — O6	112,4(6)	O1 — P2 — O3	115,0(4)
O5 — P1 — O7	108,9(5)	O1 — P2 — O7	107,3(5)
O2 — P1 — O6	102,7(5)	O4 — P2 — O3	115,9(5)
O2 — P1 — O7	111,0(4)	O4 — P2 — O7	101,2(5)
O6 — P1 — O7	106,0(5)	O3 — P2 — O7	102,7(4)
P1 — O7 — P2	128,5(6)	H4 — OW2 — H3	122(9)
		H2 — OW1 — H1	114(10)
<hr/>			
	O5 — P1 — P2 — O4		23,1(8)
	O2 — P1 — P2 — O1		6,7(5)
	O6 — P1 — P2 — O3		19,1(5)

Tailles et déformations anisotropes

L'analyse après affinement de Rietveld des différents paramètres anisotropes, de taille et de déformation, peut renseigner sur les orientations et l'organisation des cristallites, ou des domaines cohérents. Dans le cas de la phase m-CPPD, l'analyse des harmoniques sphériques révèle que les cristallites sont orientées principalement suivant l'axe [001], ce qui est cohérent avec l'orientation préférentielle observée, elle aussi suivant l'axe \vec{c} (figure III-10). La taille issue de ces analyses, de 300(200) nm suivant l'axe \vec{c} , possède une trop grande incertitude pour être analysable.

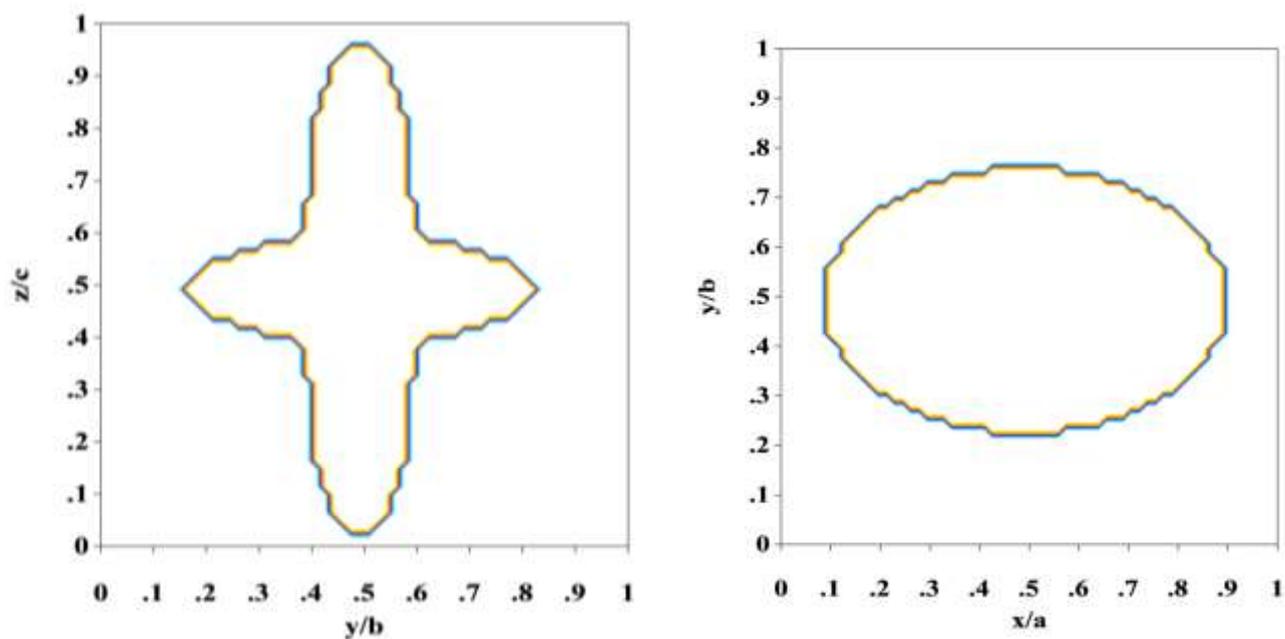


Figure III-10 : Projection des harmoniques sphériques suivant les axes du cristal après affinement Rietveld.

La structure est ordonnée par des réseaux de liaisons, covalentes, hydrogène et de coordination, orientées suivant les axes principaux [100], [010] et [001]. La cohésion du cristal est donc forte suivant ces axes. La cohésion du cristal étant minimale hors de ces directions, cela pourrait donner lieu aux profils de déformations observés (figure III-11). Les déformations observées sont bien minimales suivant ces axes validant *a posteriori* le principe de corrections anisotropes des intensités du profil.

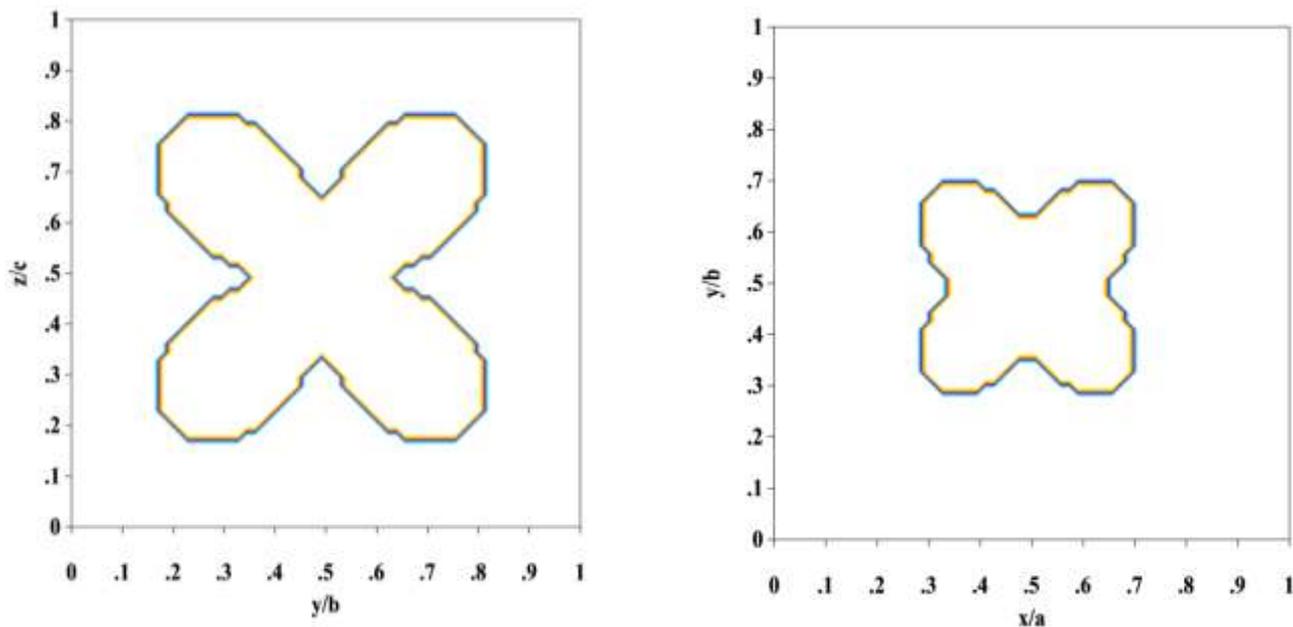


Figure III-11 : Projection des déformations anisotropes suivant les axes du cristal après affinement Rietveld.

(6) *Validation expérimentale et théorique de la structure*

La structure a pu de plus être validée par deux techniques complémentaires à la diffraction des rayons X : la diffraction des neutrons et l'étude théorique *ab initio*. Les diagrammes de diffraction des neutrons ont été réalisés en collaboration avec Gilles André du Laboratoire Léon Brillouin (Gif sur Yvette) sur le diffractomètre G4-1 présenté en annexe. La modélisation de la structure par calcul *ab initio* a été réalisée en collaboration avec Jincheng Du du Center for Advanced Scientific Computing and Modeling (CASCaM) - Materials Science and Engineering department à l'University of North Texas (Denton, TX, USA) lors d'un séjour de 2 mois effectué d'octobre à décembre 2013 durant ma troisième année de thèse.

Diffraction des neutrons

La résolution du diffractomètre G4-1 du laboratoire Léon Brillouin (LLB) ne permettant pas la résolution d'une structure fine, cet outil a été utilisé pour valider la structure obtenue après analyse du diagramme de diffraction des rayons X. Cette technique est particulièrement adaptée au positionnement des atomes de faible numéro atomique mais ayant des longueurs de diffusion des neutrons importantes, notamment pour les atomes d'hydrogène. La substitution des atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium pouvant réduire l'absorption des neutrons n'a pas été tentée dans notre cas.

L'analyse Rietveld du diagramme de diffraction des neutrons a été réalisée sans modifier les paramètres de maille ni les positions des atomes lourds (Ca, P et O1 à O7) dans la maille. Les contributions instrumentales ont été fournies par Gilles André, responsable de la ligne G4-1 au LLB, et considérées comme majoritaires. Seules les positions des atomes d'hydrogène et d'oxygène associés ont été modifiées, ainsi que le facteur d'échelle et le facteur d'agitation thermique global. Les résultats de l'affinement Rietveld du diagramme de diffraction des neutrons (figure III-12) et les données associées sont reportées dans les tableaux III-7 et III-8.

Tableau III-7 : Données de l'affinement par la méthode de Rietveld du diagramme de diffraction des neutrons du m-CPPD synthétisé

m-CPPD (Rietveld)	
Système cristallin, Groupe d'espace	Monoclinique, $P2_1/n$
Température (K)	293
a, b, c (Å)	12,60831, 9,24257, 6,74882
β (°)	104,99267
V (Å ³)	759,69
Z	4
Radiation	Neutron longueur d'onde constante, $\lambda = 2,423$ Å
Diffractomètre	2-axes G4-1, LLB
Porte échantillon	Capillaire 8 mm
2θ (°)	$2\theta_{\min} = 7,02$; $2\theta_{\max} = 86,92$; $2\theta_{\text{step}} = 0,10$
Affinement	
Facteurs d'accord de profil (%)	$R_p = 1,03$, $R_{wp} = 1,40$, $R_{\text{exp}} = 0,85$, $\chi^2 = 2,72$
Facteurs d'accord de structure (%)	$R_{\text{Bragg}} = 3,58$; $R_F = 4,87$
No, de point de mesure	800
No, de réflexion	172
No, de paramètre affiné	21
No, of contrainte	0
Affinement des H	Indépendant
Fonction utilisée	Pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings
Paramètres d'affinement	
U, V, W	0,821 ; -0,237 ; 0,078
X, Y	0,000; 0,156

Tableau III-8 : Coordonnées atomiques de la structure du m-CPPD obtenue par diffraction des neutrons et distances entre les positions atomiques des structures obtenues par analyse de diffraction de RX et diffraction des neutrons suivant a, b et c et distances totales (Å).

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	ΔX (Å)	ΔY (Å)	ΔZ (Å)	Δd_{X-X} (Å)
Ca1	0,6437	0,6236	0,2137				
Ca2	0,3768	0,6211	0,3298				
H1	0,339(3)	0,934(4)	0,363(5)	0,416	0,342	0,243	0,646
H2	0,443(2)	0,921(4)	0,285(5)	0,252	0,684	0,560	1,028
H3	0,126(3)	0,522(5)	0,722(7)	0,328	0,083	0,337	0,536
H4	0,171(2)	0,589(3)	0,936(5)	0,366	0,323	0,229	0,591
O1	0,6384	0,3789	0,3302				
O2	0,5698	0,6394	0,5193				
O3	0,5435	0,3503	0,9506				
O4	0,1670	0,3521	0,6627				
O5	0,1964	0,6587	0,1959				
O6	0,3372	0,3888	0,1287				
O7	-0,0172	0,3009	0,7140				
OW1	0,8945	0,6280	0,8315				
OW2	0,1317	0,6115	0,7720				
P1	0,3859	0,2726	0,2889				
P2	0,0929	0,2217	0,6628				

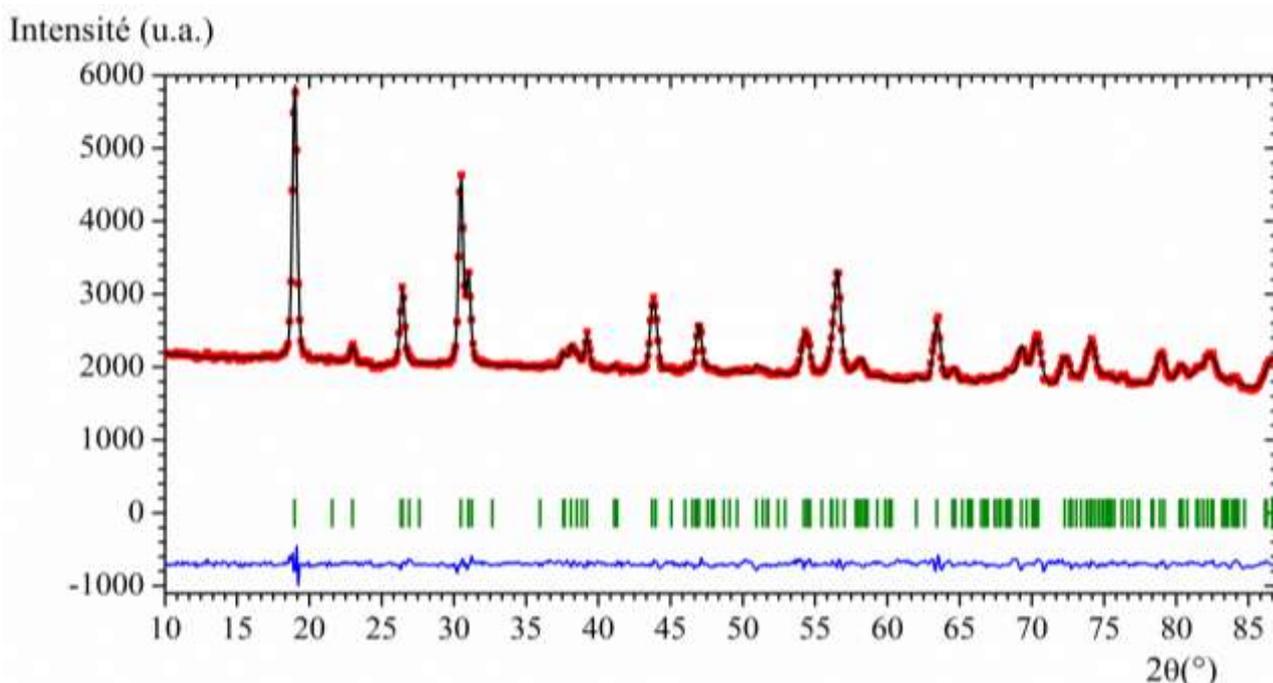


Figure III-12 : Diagramme Rietveld de la phase m-CPPD analysée par diffraction des neutrons. Les données acquises sont représentées par des points rouges, le profil simulé par une ligne noire et la différence par une ligne bleue. Les barres verticales indiquent les positions des pics de Bragg.

Les modifications apportées par cet affinement ne portent que sur les molécules d'eau. La structure est ainsi légèrement modifiée avec un réseau de liaisons hydrogène différent mais cohérent avec les positionnements des pyrophosphates (figure III-13).

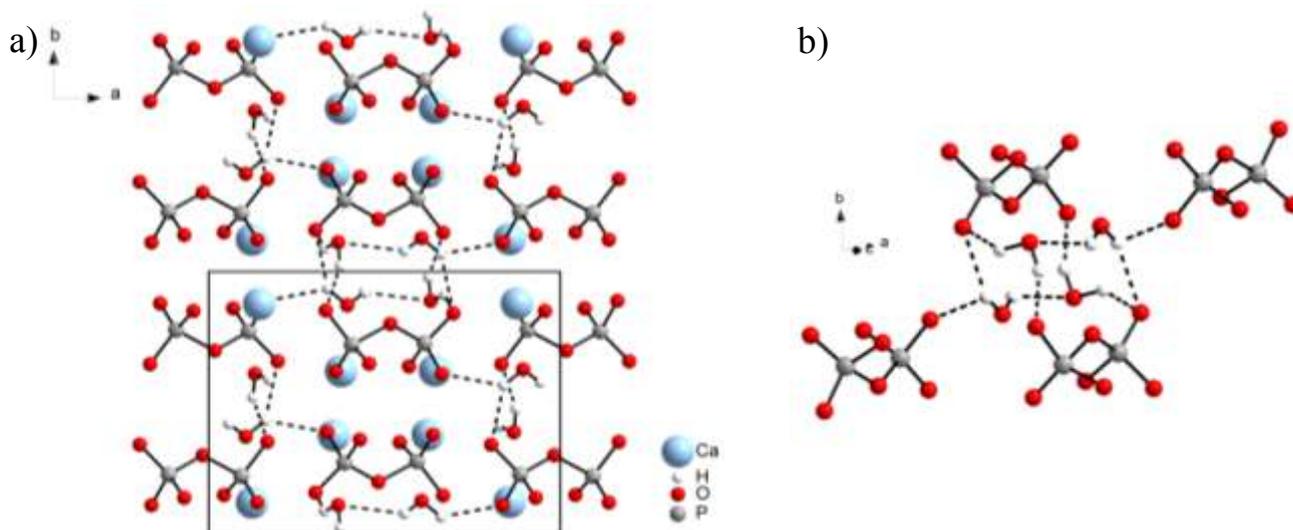


Figure III-13 : Représentation a) de la structure de la phase m-CPPD et b) réseau de liaisons hydrogène après affinement des positions des atomes d'hydrogène par analyse du diagramme de diffraction des neutrons

Les distances présentées dans le tableau III-9 sont de plus cohérentes avec la géométrie attendue pour des molécules d'eau dans un réseau de liaisons hydrogène.

Tableau III-9: Paramètres géométriques sélectionnés (distances en Å et angles en °)

OW1 — H1	0,97(4)	O5 — H1	2,13(4)
OW1 — H2	0,88(3)	O6 — H1	2,27(4)
		OW2 — H2	2,42(3)
OW2 — H3	0,89(5)	O4 — H3	1,73(5)
OW2 — H4	1,11(3)	O5 — H4	1,81(3)
	OW1 — H2 — H1		112(3)
	OW2 — H3 — H4		100(3)

Les positionnements des atomes d'hydrogène déterminés par l'analyse Rietveld du diagramme de diffraction des neutrons seront ainsi conservés par la suite pour la description de la structure. Une analyse Rietveld sur le diagramme de diffraction des RX sur synchrotron avec ces positions atomiques ne conduit cependant pas à une amélioration de l'affinement.

Modélisation ab initio

La modélisation *ab initio* a été réalisée en utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) afin de représenter l'état fondamental du modèle et le comparer aux mesures expérimentales.

Les simulations sont effectuées via le logiciel Materials Studio version 7.0 en utilisant le module DMol3. Les calculs ont été effectués en utilisant l'approximation des gradients généralisés, ou fonctionnelle d'échange non-locale, issue de la corrélation de Perdew-Burke-Ernzerh (GGA-PBE) associée à la correction de dispersion (DFT-D) de Grimme [Perdew *et al.*, 1996; Grimme, 2006]. Cette fonctionnelle a été choisie pour sa plus grande fiabilité vis-à-vis du système considéré. Ce modèle est ainsi adapté au calcul de densité électronique possédant des variations spatiales importantes liées à la présence de différents atomes et des liaisons dans lesquelles ils sont engagés : dans notre cas des liaisons de types ionique, hydrogène et covalente. Les orbitales atomiques numériques utilisées pour résoudre les équations de la théorie du champ auto-cohérent sont prises dans la base DNP 4.4 (*Double Numerical plus Polarization*) disponible sur Material Studio. Cette base est utilisée afin de tenir compte des liaisons hydrogène de la façon la plus précise possible, ces liaisons étant essentielles dans nos systèmes. L'échantillonnage de la zone de Brillouin considérée correspond à une grille de Monkhorst et Pack 1 x 2 x 2 et les orbitales des électrons de cœur ont été toutes calculées [Monkhorst & Pack, 1976]. Les fonctions sont calculées avec une limite à 5,5 Å correspondant à la limite de sensibilité des orbitales de l'atome de calcium.

Les calculs ont été réalisés à partir d'une structure approximative ne comportant pas d'atomes d'hydrogène. Ceux-ci ont été ajoutés par la suite au travers d'une fonction spécifique du logiciel, basée sur des considérations géométriques. Cette structure a été obtenue à partir de l'analyse d'un diagramme acquis sur le diffractomètre D8 Advance du laboratoire CIRIMAT. Les critères de convergence ont été fixés à 10^{-5} Hartree pour l'énergie, 0,005 Å pour les déplacements et 0,002 Ha/Å pour la force subie. Les positions atomiques et les paramètres de maille ont été affinés afin d'obtenir la structure la plus stable. La structure identifiée correspond à un minimum d'énergie, situé à -10868,66689 Hartrees dont -12,92534 Ha d'énergie de liaison. Les résultats de la modélisation ont été rassemblés dans les tableaux III-10 et III-11.

Tableau III-10 : Paramètres de maille obtenus par les différentes méthodes : Rietveld et DFT.

	Méthode.	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
m-CPPD	DFT	12,7276	9,2582	6,8624	90,00	105,4533	90,00
	Rietveld	12,60831(5)	9,24257(4)	6,74882(2)	90,00	104,99267(9)	90,00
Différence		0,95 %	0,17 %	1,68 %		0,44 %	

Tableau III-11 : Coordonnées atomiques de la structure m-CPPD obtenue par DFT et distances entre les positions atomiques des structures obtenues par analyse de diffraction des RX et DFT suivant a, b et c et distances totales (Å). Les distances sont établies sur la base de paramètres de maille égaux, correspondant à ceux de la structure établie par analyse Rietveld.

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	ΔX (Å)	ΔY (Å)	ΔZ (Å)	Δd_{x-x} (Å)
Ca1	0,64456	0,62339	0,20449	0,0108	0,0019	0,0622	0,066
Ca2	0,37820	0,62537	0,32630	0,0177	0,0395	0,0236	0,054
H1	0,36188	0,96828	0,31255	0,288	0,317	0,340	0,612
H2	0,37809	0,886	0,12508	0,818	0,323	1,079	1,559
H3	0,13775	0,53108	0,71321	0,148	0,084	0,059	0,194
H4	0,15452	0,61741	0,91873	0,208	0,263	0,117	0,382
O1	0,63938	0,38203	0,33887	0,0124	0,0289	0,0585	0,073
O2	0,56991	0,63718	0,50836	0,0014	0,0205	0,0738	0,082
O3	0,54601	0,35392	0,96459	0,0316	0,0335	0,0944	0,115
O4	0,16329	0,3548	0,64906	0,0468	0,0250	0,0921	0,118
O5	0,18880	0,65047	0,18386	0,0958	0,0761	0,0813	0,163
O6	0,33414	0,38623	0,12274	0,0386	0,0238	0,0402	0,068
O7	-0,01369	0,30395	0,72934	0,0443	0,0282	0,1035	0,128
OW1	0,88686	0,6249	0,77163	0,0963	0,0287	0,4041	0,4409
OW2	0,14832	0,62897	0,77301	0,2096	0,1615	0,0068	0,2664
P1	0,38473	0,27774	0,29137	0,0148	0,0475	0,0167	0,056
P2	0,08975	0,22594	0,66802	0,0397	0,0392	0,0352	0,073

Les paramètres de maille sont proches, moins de 2% de différence relative, ce qui indique une bonne prise en charge des différentes liaisons et contraintes. On constate aussi que les placements des atomes lourds, calcium et phosphore, sont très semblables suivant les deux techniques avec moins de 0,1Å d'écart entre les positions des deux structures. Cet écart augmente pour les atomes d'oxygène de la molécule de pyrophosphate, sans toutefois dépasser 0,170 Å. Les liaisons covalentes ne permettent pas un éloignement trop important de l'atome de phosphore central, mais des rotations auraient pu avoir lieu autour de cet atome. Finalement, les modifications les plus importantes sont à observer sur les molécules d'eau avec 0,3 Å et 0,4 Å pour les atomes d'oxygène et jusqu'à 1,5 Å pour les atomes d'hydrogène, à comparer au 1 Å de la liaison OW-H et au 1,5 Å de distance entre deux atomes d'hydrogène dans une molécule d'eau. Ces écarts peuvent être attribués à la fois à la résolution structurale, sur le placement des atomes d'hydrogène, et à la modélisation, les liaisons hydrogène étant particulièrement complexes à modéliser. Nous remarquons d'ailleurs que les écarts les plus importants ne concernent qu'une molécule d'eau H1-OW1-H2. La structure affinée du m-CCPD est représentée sur la figure III-14.

Notons que le réseau de liaisons hydrogène obtenu par modélisation *ab initio* est plus proche de celui déterminé par analyse Rietveld de la diffraction des rayons X que de celle de la diffraction des

neutrons.

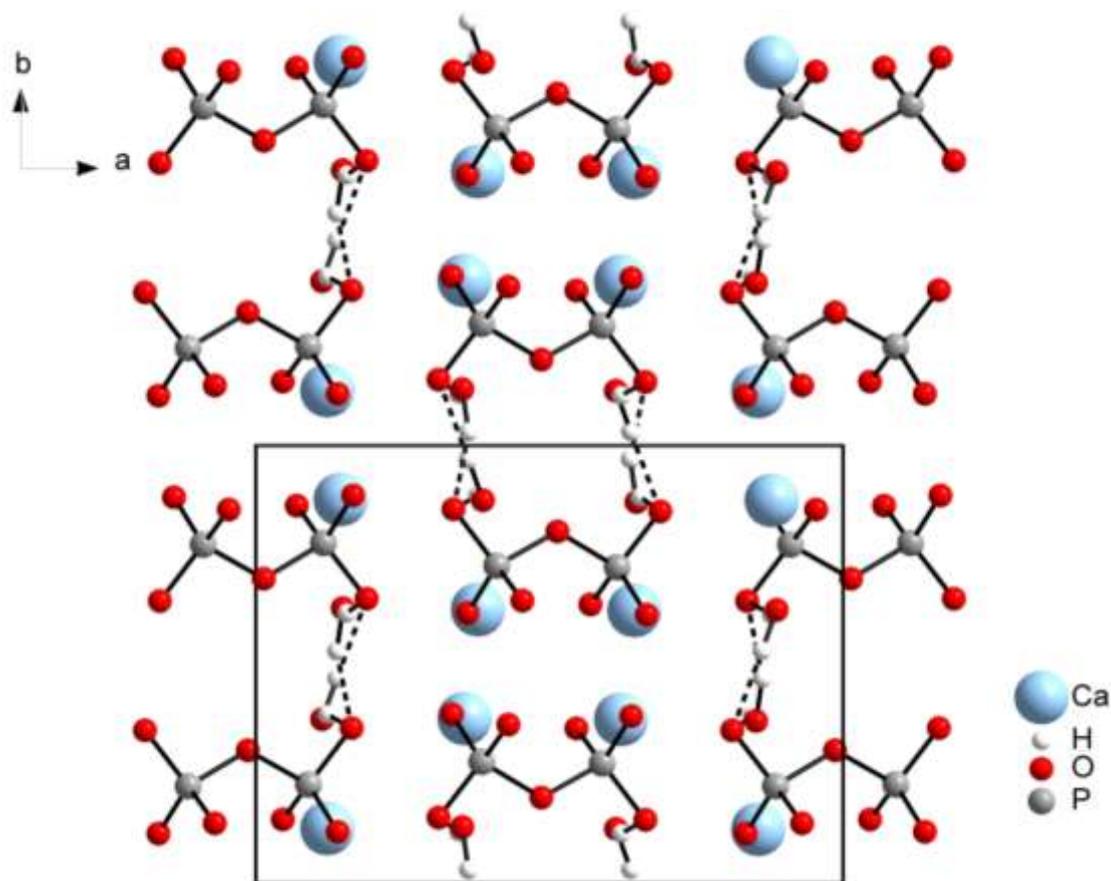


Figure III-14 : Représentation de la structure de la phase m-CPPD DFT suivant l'axe [001] avec représentation des molécules de pyrophosphate et des liaisons hydrogène.

Cette configuration est apparue dans les premières étapes de la modélisation comme un état stable de configuration. Des simulations à partir de la structure affinée devront être effectuées afin de vérifier le caractère global de l'état d'équilibre.

(7) Synthèse sur l'étude de la structure de la phase m-CPPD

La structure de la phase m-CPPD a donc été déterminée par une combinaison d'analyses structurales par diffraction des rayons X sur synchrotron, diffraction des neutrons et modélisation *ab initio* DFT. Les paramètres de maille et les positions atomiques ont ainsi été fixés après analyse des différents résultats et sont récapitulés dans les tableaux III-12 et III-13. Réciproquement, le modèle *ab initio* de la phase a aussi été validé par comparaison avec les solutions expérimentales.

Tableau III-12 : Paramètres de maille de la structure de la phase m-CPPD.

	Méthode	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
m-CPPD	Mixte	12,60831(5)	9,24257(4)	6,74882(2)	90,00	104,99267(9)	90,00

Tableau III-13 : Coordonnées atomiques et déplacements quadratiques moyens isotropes (Å^2).

	x	y	z	U_{iso}^*/U_{eq}
Ca1	0,6437(2)	0,6236(5)	0,2137(4)	0,0248(11)
Ca2	0,3768(2)	0,6211(5)	0,3298(4)	0,0382(13)
H1	0,339(3)	0,934(4)	0,363(5)	0,063*
H2	0,443(2)	0,921(4)	0,285(5)	0,063*
H3	0,126(3)	0,522(5)	0,722(7)	0,063*
H4	0,171(2)	0,589(3)	0,936(5)	0,063*
O1	0,6384(6)	0,3789(11)	0,3302(10)	0,014(2)
O2	0,5698(5)	0,6394(10)	0,5193(10)	0,006(2)
O3	0,5435(6)	0,3503(9)	0,9506(10)	0,025(3)
O4	0,1670(6)	0,3521(11)	0,6627(11)	0,023(3)
O5	0,1964(5)	0,6587(9)	0,1959(10)	0,001(2)
O6	0,3372(7)	0,3888(10)	0,1287(11)	0,044(3)
O7	-0,0172(7)	0,3009(5)	0,7140(12)	0,0190(19)
OW1	0,8869(7)	0,6249(16)	0,7716(16)	0,044(3)
OW2	0,1483(9)	0,629(2)	0,7730(11)	0,044(3)
P1	0,3859(4)	0,2726(7)	0,2889(6)	0,0402(16)
P2	0,0929(4)	0,2217(6)	0,6628(6)	0,0354(14)

* Les déplacements quadratiques moyens des atomes d'hydrogène sont fixés pour correspondre à ceux de la structure t-CPPD.

La structure de la phase m-CPPD, rencontrée *in vivo* dans les articulations de patients arthritiques, pourra être utilisée pour l'étude des propriétés physico-chimiques et inflammatoires des cristaux de pyrophosphate de calcium. Sa détermination structurale représente donc une étape importante dans la compréhension des mécanismes impliqués dans différents types d'arthrose.

A2 b) Résolution de la structure de la phase t-CPPD

(1) Données bibliographiques [Mandel, 1975]

La structure de la phase t-CPPD a été résolue entièrement, positionnement des atomes d'hydrogène compris, par Mandel à partir de données de DRX acquises sur monocristal. Cette phase étant l'une des deux phases présentes dans les articulations de patients arthritiques, au côté de la phase

m-CPPD, la connaissance de sa structure est essentielle afin de mieux comprendre les potentiels inflammatoires des pyrophosphates de calcium. La bonne qualité des échantillons de t-CPPD synthétisés nous permet de nous approcher de la résolution obtenue par Mandel afin aussi de vérifier les paramètres employés lors des affinements.

(2) Affinement de la structure

Un premier affinement a été réalisé sur les paramètres de maille et les positions des atomes, hydrogène compris, par analyse du diagramme de diffraction de rayons X obtenu sur la ligne Cristal du synchrotron Soleil puis les positions atomiques des atomes d'hydrogène ont été affinées grâce à la diffraction des neutrons réalisée au LLB. Les analyses Rietveld des diagrammes de diffraction des rayons X synchrotron (Figure III-15) et de diffraction des neutrons (Figure III-16) ont été récapitulées dans le tableau III-14.

Tableau III-14 : Données de l'affinement du diagramme de t-CPPD par la méthode de Rietveld.

t-CPPD (Rietveld)	
Système cristallin, Groupe d'espace	Triclinique, $P - 1$
Température (K)	293
a, b, c (Å)	7,353342 (9) ; 8,273642 (10) ; 6,684825 (6)
β (°)	102,83456 (8) ; 72,72374 (8) ; 94,96764 (9)
V (Å ³)	378,55 (1)
Z	4
Radiation	Rayon X Synchrotron, $\lambda = 0,72442$ Å Neutron longueur d'onde constante, $\lambda = 2,423$ Å
Rayons X	
Diffractomètre	2-cercles Cristal, Soleil
Porte échantillon	Capillaire 0,7 mm
2θ (°)	$2\theta_{\min} = 0,20$ $2\theta_{\max} = 50,00$ $2\theta_{\text{step}} = 0,002$
Affinement	
Facteurs d'accord de profil (%)	$R_p = 7,03$; $R_{wp} = 8,92$; $R_{exp} = 5,71$; $\chi^2 = 2,44$
Facteurs d'accord de structure (%)	$R_{Bragg} = 5,86$; $R_F = 6,35$
No, de point de mesure	24994
No, de réflexion	1294
No, de paramètre affiné	95
No, de contrainte	0

t-CPPD (Rietveld)

Fonction utilisée	Pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings anisotrope
Paramètres d'affinement	
U, V, W	0,0065 (1) ; -0,0009 (1) ; 0,0001(1)
X, Y	0,0360(4) ; 0,0009(1)
Z	0,0003(1)
Orientation préférentielle	
$GI (100)$	0,998(1)
Neutrons	
Diffractomètre	2-axes G4-1, LLB
Porte échantillon	Capillaire 8 mm
2θ (°)	$2\theta_{\min} = 7,02$; $2\theta_{\max} = 86,92$; $2\theta_{\text{step}} = 0,10$
Affinement	
Facteurs d'accord de profil (%)	$R_p = 1,44$, $R_{wp} = 2,00$, $R_{\text{exp}} = 0,83$, $\chi^2 = 5,82$
Facteurs d'accord de structure (%)	$R_{\text{Bragg}} = 5,19$; $R_F = 8,23$
No, de point de mesure	800
No, de réflexion	142
No, de paramètre affiné	22
No, of contrainte	0
Affinement des H	Indépendant

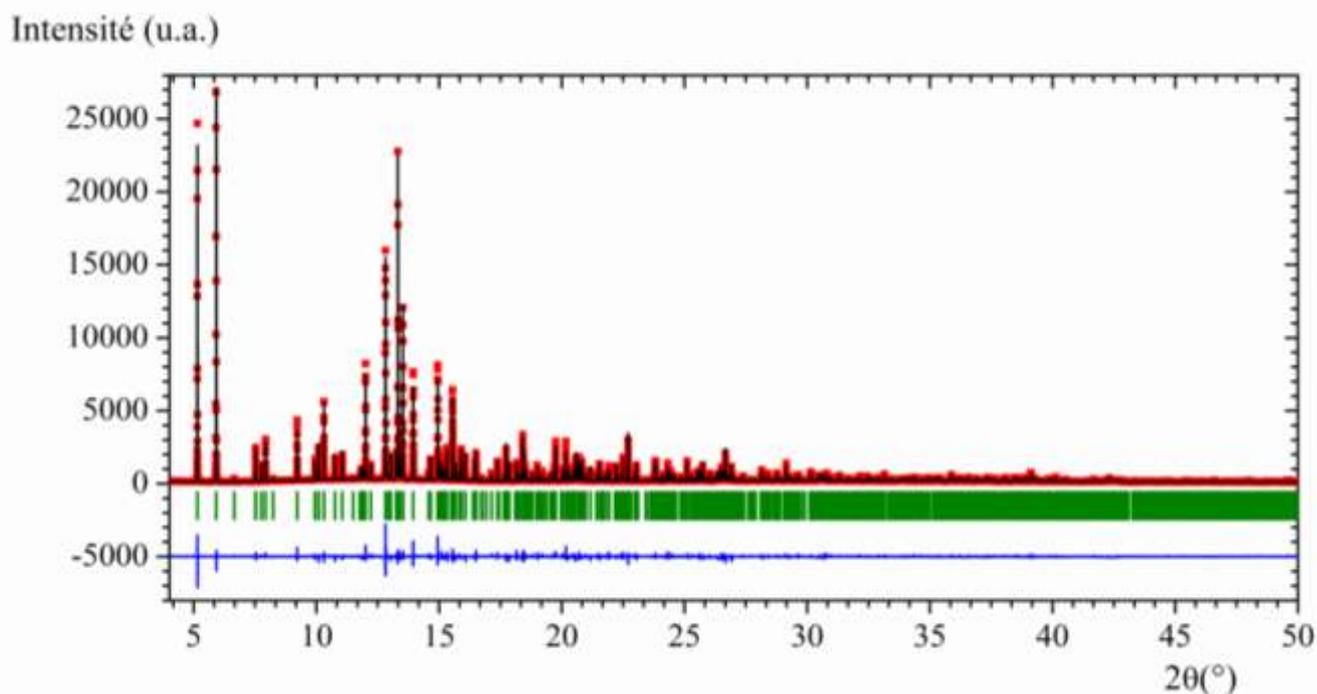


Figure III-15 : Diagramme Rietveld de la phase t-CPPD analysée par diffraction des rayons X sur synchrotron. Les données acquises sont représentées par des points rouges, le profil simulé par une ligne noire et la différence par une ligne bleue. Les barres verticales indiquent les positions des pics de Bragg.

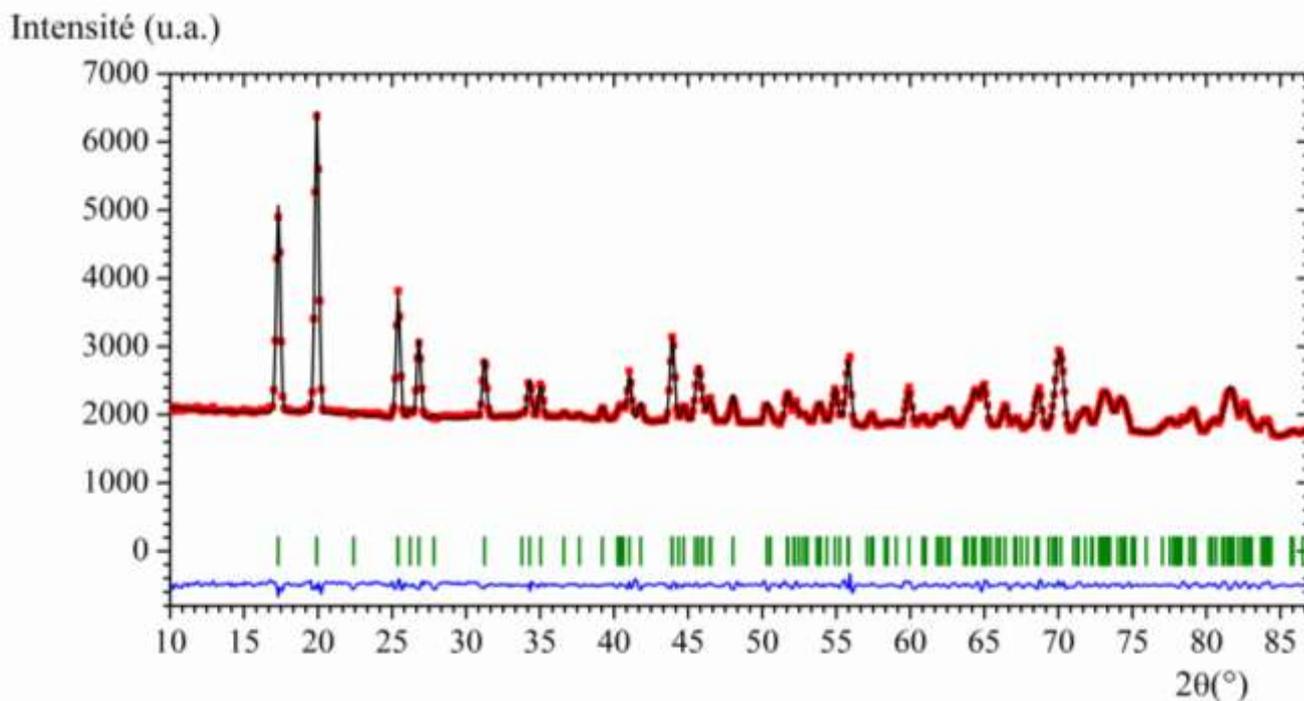


Figure III-16 : Diagramme Rietveld de la phase t-CPPD analysée par diffraction des neutrons. Les données acquises sont représentées par des points rouges, le profil simulé par une ligne noire et la différence par une ligne bleue. Les barres verticales indiquent les positions des pics de Bragg.

La structure ainsi obtenue (figure III-17) est très proche de celle déterminée par Mandel, avec moins de 0,05 Å d'écart entre les deux structures pour les atomes lourds et 0,2 Å pour les atomes

d'hydrogène. Les coordonnées atomiques et déplacements quadratiques moyens sont reportés dans le tableau III-15.

Tableau III-15 : Coordonnées atomiques et déplacements quadratiques moyens isotropes (\AA^2).

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U_{iso}^*/U_{eq}
Ca1	0,24843(17)	0,50672(14)	0,31015(19)	0,0061(4)
Ca2	0,86436(17)	0,75696(16)	0,26036(19)	0,0077(4)
H1	0,538(8)	0,760(8)	0,144(8)	0,063*
H2	0,474(8)	0,844(6)	0,321(9)	0,063*
H3	0,243(7)	0,020(7)	0,349(9)	0,063*
H4	0,399(7)	0,122(6)	0,318(9)	0,063*
O1	0,0136(5)	0,0063(4)	0,2520(5)	0,0049(12)
O2	0,9865(4)	0,2993(4)	0,4793(5)	0,0010(11)
O3	0,1340(5)	0,2637(4)	0,0917(5)	0,0021(12)
O4	0,7799(5)	0,1942(4)	0,2253(5)	0,0066(12)
O5	0,5028(5)	0,3198(4)	0,1797(5)	0,0045(12)
O6	0,7422(5)	0,5005(4)	0,3412(5)	0,0029(11)
O7	0,8284(5)	0,3709(4)	0,9443(5)	0,0105(13)
OW1	0,5015(7)	0,7437(6)	0,2549(8)	0,0138(15)
OW2	0,3326(6)	0,0669(6)	0,4004(7)	0,0158(15)
P1	0,9910(2)	0,1864(2)	0,2594(3)	0,0078(6)
P2	0,7126(2)	0,3563(2)	0,1661(3)	0,0090(6)

* Les déplacements quadratiques moyens des atomes d'hydrogène sont fixés pour correspondre à ceux de la structure déterminée par Mandel *et al.* [Mandel, 1975].

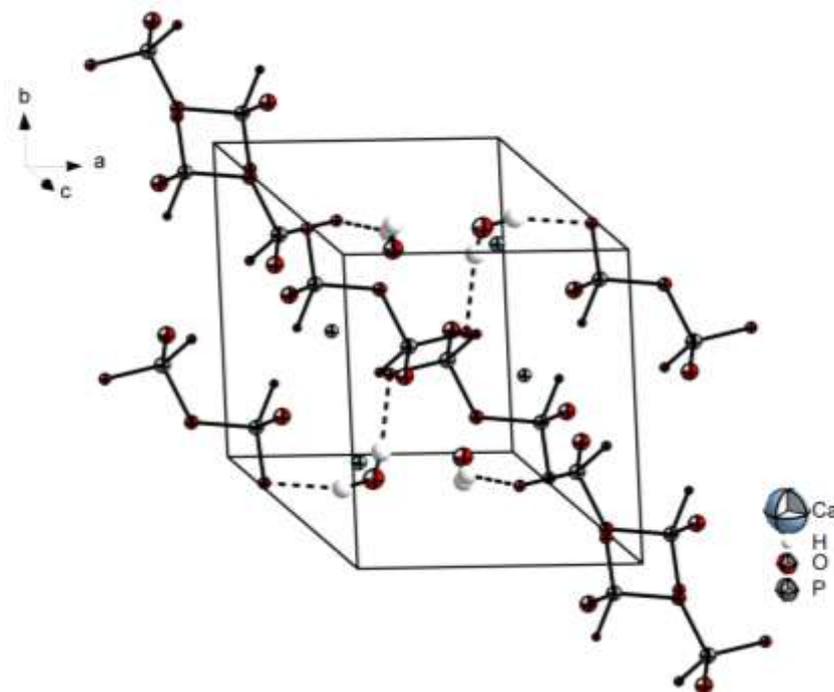


Figure III-17 : Structure de la phase t-CPPD avec représentation des molécules de pyrophosphate et des liaisons hydrogène. Les ellipsoïdes sont représentés à 75% de probabilité.

(3) *Modélisation de la structure*

La modélisation *ab initio* a été réalisée via le logiciel Materials Studio version 7.0 utilisé dans les mêmes conditions que pour la structure du m-CPPD. L'échantillonnage de la zone de Brillouin considérée correspond à une grille de Monkhorst et Pack 2 x 2 x 2 et les orbitales des électrons de cœur ont été toutes calculées, sans pseudo-potentiel [Monkhorst & Pack, 1976].

La structure identifiée correspond à un minimum d'énergie, situé à -5434,35305 Hartrees dont -6,48449 Ha d'énergie de liaison. Remarquons que cette énergie, ramenée à une unité formulaire, est inférieure de 0,00980 Ha, soit 25,7 kJ.mol⁻¹, à celle de la phase m-CPPD et l'énergie de liaison totale varie de 28,6 kJ.mol⁻¹ soit l'ordre de grandeur de l'énergie d'une liaison hydrogène modérée impliquée dans ces structures [Jeffrey, 1997] La phase t-CPPD correspondrait donc à un état thermodynamiquement plus stable, la phase étant déjà décrite comme étant la plus stable en condition acide [Gras *et al.*, 2013a]. Les résultats de la modélisation ont été rassemblés dans les tableaux III-16 et III-17.

Tableau III-16 : Paramètres de maille obtenus par les différentes méthodes : Rietveld et DFT.

Méthode		a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
t-CPPD	DFT	7,3823	8,1533	6,7088	102,9722	72,5226	94,8006
	Rietveld	7,3533(1)	8,2736(1)	6,6848(1)	102,8346(1)	72,7237(1)	94,9676(1)
Différence		0,39 %	1,45 %	0,36 %	0,13 %	0,28 %	0,18 %

Tableau III-17 : Coordonnées atomiques de la structure t-CPPD obtenue par DFT et distances entre les positions atomiques des structures obtenues par affinement Rietveld et DFT suivant a, b et c et distances totales (Å). Les distances sont établies sur la base de paramètres de maille égaux, correspondant à ceux de la structure établie par analyse Rietveld.

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	ΔX (Å)	ΔY (Å)	ΔZ (Å)	Δd_{x-x} (Å)
Ca1	0,25691	0,51421	0,31150	0,062	0,062	0,009	0,090
Ca2	0,85697	0,75635	0,25885	0,054	0,005	0,010	0,060
H1	0,51486	0,74812	0,09565	0,170	0,098	0,323	0,40
H2	0,44597	0,86342	0,32317	0,206	0,161	0,015	0,27
H3	0,22589	0,0197	0,33684	0,126	0,002	0,081	0,17
H4	0,40959	0,13475	0,30924	0,078	0,105	0,059	0,14
O1	0,03084	0,00242	0,24907	0,127	0,032	0,020	0,128
O2	0,98919	0,30057	0,48283	0,020	0,011	0,024	0,035
O3	0,13852	0,26894	0,09185	0,033	0,043	0,001	0,052
O4	0,78304	0,1862	0,22702	0,023	0,066	0,011	0,076
O5	0,50036	0,30433	0,17269	0,018	0,128	0,047	0,128
O6	0,72716	0,50042	0,34630	0,111	0,001	0,034	0,106
O7	0,83031	0,37098	0,94370	0,014	0,001	0,004	0,013
OW1	0,50179	0,75025	0,24871	0,002	0,054	0,041	0,075
OW2	0,33305	0,05791	0,40057	0,003	0,074	0,001	0,075
P1	0,99535	0,18636	0,26085	0,032	0,000	0,010	0,036
P2	0,70955	0,34971	0,16673	0,022	0,055	0,004	0,058

Les écarts observés, autant pour les paramètres de maille que pour les placements atomiques, sont de l'ordre du pourcent entre la structure DFT et l'affinement par la méthode Rietveld. Les écarts les plus importants, hors positionnement des atomes d'hydrogène, correspondent à l'atome O5 impliqué dans deux liaisons hydrogène. Les atomes d'oxygène OW1 et OW2 n'ont quant à eux été que peu modifiés malgré les différences de position de l'atome d'hydrogène, celles-ci restant faibles à l'échelle de la molécule.

La modélisation *ab initio* semble donc en accord avec les données expérimentales obtenues sur cette phase et pourra être utilisée par la suite pour simuler la phase t-CPPD.

A2 c) Résolution de la structure de la phase m-CPPT β et de ses dérivés

La phase m-CPPT β a été décrite comme une phase intermédiaire dans l'évolution des pyrophosphates de calcium *in vivo* menant aux phases dihydratées m-CPPD et t-CPPD. Elle n'a cependant pas été identifiée dans les articulations de patient arthritique. Cette phase s'avère aussi utile pour l'étude des évolutions des pyrophosphates de calcium à hautes températures, notamment des phases amorphes et des verres phosphatés. Une description fine de sa structure a donc été entreprise.

(1) Données bibliographiques [Balić-Žunić *et al.*, 2000]

La structure de la phase m-CPPT β a été résolue par diffraction des rayons X sur monocristal par Balić-Žunić *et al.*, la qualité des cristaux disponibles ne permettant cependant pas le positionnement des atomes d'hydrogène [Balić-Žunić *et al.*, 2000]. Cette structure est organisée en couche suivant l'axe [100], alternant des couches contenant les molécules de pyrophosphates et les ions calcium et des couches composées de molécules d'eau liées entre elles par liaisons hydrogène. Remarquons que les couches contenant les molécules de pyrophosphates et les ions calcium peuvent elles-mêmes être décrites comme une alternance suivant l'axe [001] de molécules de pyrophosphate et d'ions calcium (figure III-18).

La cohésion du cristal est donc assurée en grande partie par les liaisons établies au travers de la couche hydratée. Plusieurs types de molécules d'eau ont été identifiés dans cette couche, suivant le nombre de coordination les liant aux atomes de calcium environnants. L'atome OW1 est ainsi lié à deux atomes de calcium, les atomes OW2 et OW3 à un seul calcium et OW4 est maintenu dans la structure uniquement par liaison hydrogène (figure III-18). Cette organisation a ainsi été reliée aux différentes étapes de déshydratation subies par la phase à haute température, avec la perte de la molécule d'eau OW4 à basse température (30°C) puis les libérations simultanées des molécules OW3 et OW2 pour former un composé monohydraté m-CPPM ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7, \text{H}_2\text{O}$). Ce composé monohydraté subit à son tour une hydrolyse aux environs de 200°C pour évoluer en brushite (CaHPO_4). L'évolution de ce système a été récemment décrite et nous ne possédons que peu d'informations sur les états intermédiaires.

Le manque d'informations sur ces phases et sur le placement des atomes d'hydrogène dans le m-CPPT β ne permet cependant pas l'étude complète de ce système et de ces déshydratations. Cette section portera sur la détermination la plus complète possible de la structure de la phase m-CPPT β et de ces différentes étapes de déshydratation. L'étude des mécanismes de déshydratation sera présentée dans le chapitre IV.

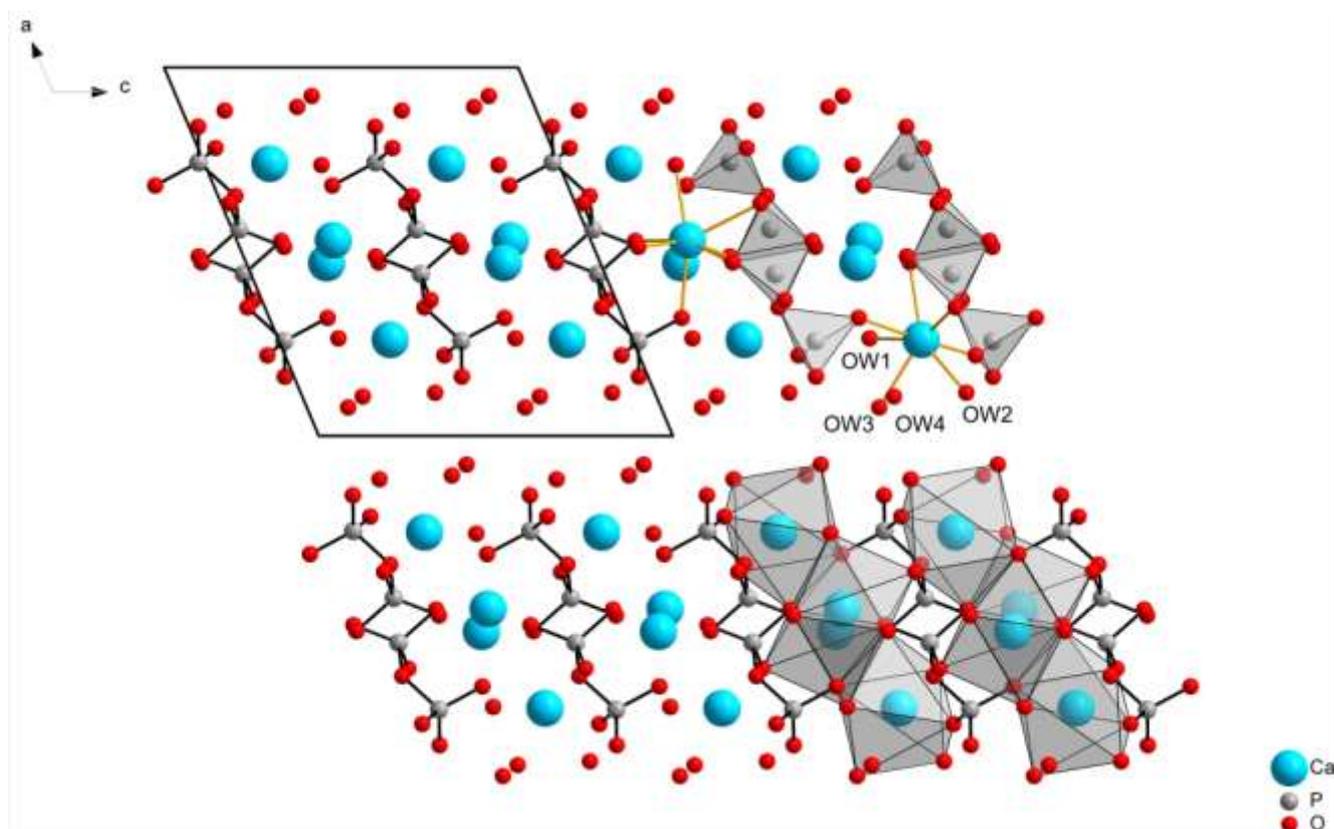


Figure III-18 : Structure de la phase m-CPPT β suivant l'axe [010] avec représentation des molécules de pyrophosphate organisées suivant l'axe [100] et les couches hydratées organisées sur (010) [Balić-Žunić *et al.*, 2000].

(2) Détermination de la structure de m-CPPT β

La précision des différentes données expérimentales dont nous disposons ne permettant pas le placement direct des atomes d'hydrogène dans la structure, une approche mixte combinant calcul *ab initio* et analyse Rietveld a été entreprise afin de s'approcher le plus possible d'une solution vraisemblable.

Modélisation *ab initio*

La modélisation *ab initio* a été réalisée via le logiciel Materials Studio version 7.0 utilisant les mêmes conditions que précédemment. L'échantillonnage de la zone de Brillouin considérée correspond à une grille de Monkhorst et Pack 1 x 2 x 1 et les orbitales des électrons de cœur ont été toutes calculées, sans pseudo-potentiel [Monkhorst & Pack, 1976].

Les critères de convergence ont été fixés à 10^{-5} Hartree pour l'énergie, 0,005 Å pour les déplacements et 0,002 Ha/Å pour la force subie. Les positions atomiques et les paramètres de maille ont été affinés afin d'obtenir la structure la plus stable. La structure identifiée correspond à un minimum d'énergie, situé à -11479,94970 Hartrees dont -16,20506 Ha d'énergie de liaison. Les résultats de la modélisation ont été rassemblés dans les tableaux III-18 et III-19 et la figure III-19.

Tableau III-18 : Paramètres de maille obtenus par les différentes méthodes : Rietveld et DFT.

	Méthode	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
m-CPPT β	DFT	12,3524	7,7228	10,8158	90,00	112,6503	90,00
	[Balić-Žunić <i>et al.</i> , 2000]	12,287(6)	7,511(3)	10,775(5)	90,00	112,542(14)	90,00
	Différence	0,53 %	2,82 %	0,38 %		0,10 %	

Tableau III-19 : Coordonnées atomiques de la structure m-CPPT β obtenue par DFT et distances entre les positions atomiques des structures obtenues par Balić-Žunić *et al.* [Balić-Žunić *et al.*, 2000] et DFT suivant a, b et c et distances totales (Å). Les distances sont établies sur la base de paramètres de maille égaux, correspondant à ceux de la structure établie par Balić-Žunić *et al.*.

	x	y	z	ΔX (Å)	ΔY (Å)	ΔZ (Å)	Δd_{x-x} (Å)
Ca1	0,4721	0,0063	0,7329	0,036	0,031	0,063	0,092
Ca2	0,2613	0,1580	0,3160	0,000	0,081	0,004	0,082
P1	0,7475	0,0383	0,9883	0,063	0,086	0,037	0,126
P2	0,5619	0,2335	0,5199	0,015	0,038	0,000	0,041
O1	0,5091	0,2443	0,1264	0,047	0,025	0,002	0,054
O2	0,4696	0,2446	0,8739	0,014	0,009	0,010	0,022
O3	0,6807	0,0213	0,8351	0,015	0,054	0,001	0,057
O4	0,2062	0,1338	0,9407	0,154	0,155	0,104	0,276
O5	0,6500	0,0985	0,0510	0,015	0,035	0,021	0,050
O6	0,6298	0,0649	0,5262	0,017	0,033	0,032	0,057
O7	0,8437	0,1812	0,0269	0,057	0,163	0,012	0,178
OW1	0,2648	0,0798	0,6761	0,001	0,073	0,054	0,106
OW2	0,8700	-0,0197	0,5923	0,156	0,206	0,299	0,465
OW3	0,0802	0,1495	0,1183	0,032	0,094	0,018	0,108
OW4	0,8973	0,1543	0,3203	0,055	0,058	0,094	0,145
H1	0,786	0,493	0,803				
H2	0,779	0,592	0,922				
H3	0,953	-0,053	0,621				
H4	0,139	0,894	0,431				
H5	0,096	0,165	0,037				
H6	-0,007	0,144	0,089				
H7	0,877	0,243	0,374				
H8	0,879	0,201	0,230				

Les écarts obtenus pour les atomes lourds sont inférieurs à 0,5 Å, seule la molécule OW2 étant sensiblement déplacée par rapport à la structure d'origine. De plus, le réseau de liaisons hydrogène obtenu semble cohérent avec le placement des molécules de pyrophosphate et d'eau.

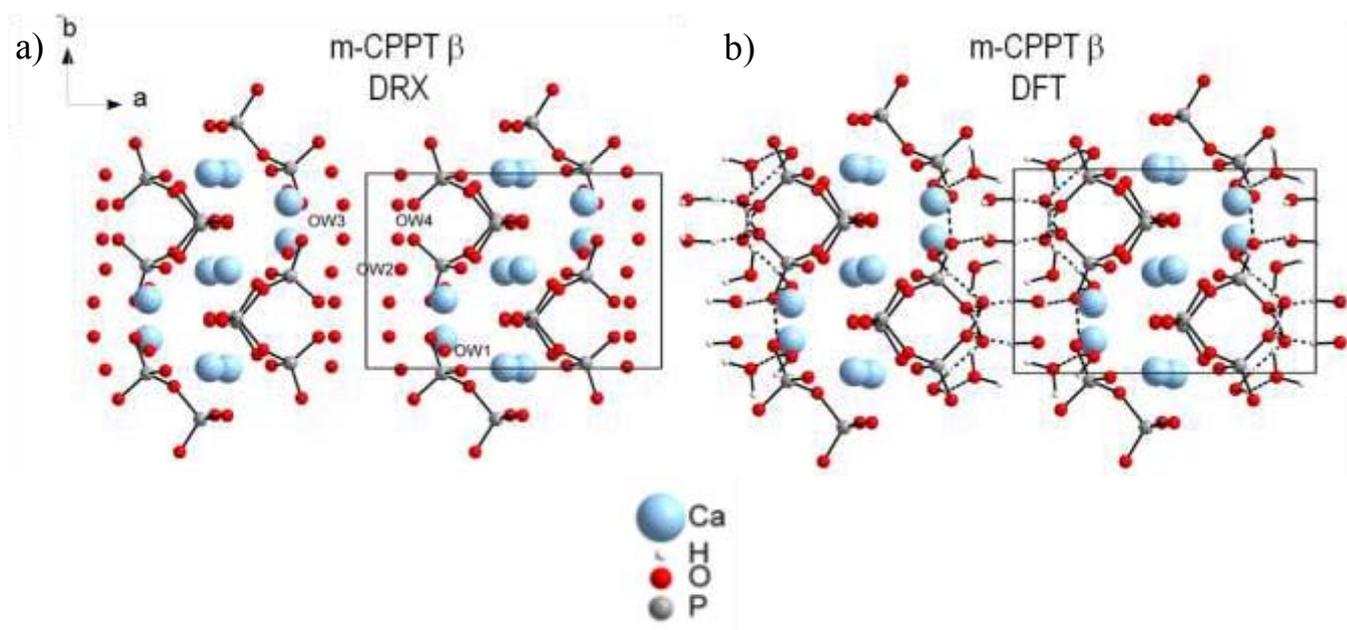


Figure III-19 : Structure de la phase m-CPPT β suivant l'axe [001] avec représentation des molécules de pyrophosphate a) d'après Balić-Žunić *et al.* [Balić-Žunić *et al.*, 2000] et b) par modélisation DFT.

Ce modèle nous a donc servi de base pour la résolution complète de la structure de la phase m-CPPT β par analyse des diagrammes de diffraction des rayons X sur synchrotron et de diffraction des neutrons.

Etude par diffraction des rayons X sur synchrotron et diffraction des neutrons

Un premier affinement a été réalisé sur les paramètres de maille et les positions des atomes les plus lourds (Ca, P, O) par analyse du diagramme de diffraction de rayons X sur synchrotron puis les positions atomiques des atomes d'hydrogène ont été affinées grâce à la diffraction des neutrons. Les analyses Rietveld des diagrammes de diffraction des rayons X sur synchrotron (figure III-20) et de diffraction des neutrons (figure III-21) ont été récapitulées dans le tableau III-20.

Tableau III-20 : Données de l'affinement du diagramme de m-CPPT β par la méthode de Rietveld.

m-CPPT β (Rietveld)	
Système cristallin, Groupe d'espace	Monoclinique, $P2_1/c$
Température (K)	293
a, b, c (Å)	12,3174(2); 7,5326(1); 10,7958(2)
β (°)	112,437(2)
V (Å ³)	925,85(1)
Z	4
Radiation	Rayon X Synchrotron, $\lambda = 0,72442$ Å Neutron longueur d'onde constante, $\lambda = 2,423$ Å
Rayons X	
Diffractomètre	2-cercles Cristal, Soleil
Porte échantillon	Capillaire 0,7 mm
2θ (°)	$2\theta_{\min} = 0,00$ $2\theta_{\max} = 50,00$ $2\theta_{\text{step}} = 0,005$
Affinement	
Facteurs d'accord de profil (%)	$R_p = 4,05$; $R_{wp} = 5,55$; $R_{exp} = 2,84$; $\chi^2 = 2,03$
Facteurs d'accord de structure (%)	$R_{Bragg} = 5,47$; $R_F = 7,93$
No, de point de mesure	9999
No, de réflexion	1585
No, de paramètre affiné	92
No, de contrainte	0
Fonction utilisée	Pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings anisotrope
Paramètres d'affinement	
U, V, W	0,0157 (76) ; -0,0009 (2) ; 0,0001(1)
X, Y	0,1075(53) ; 0,0049(5)
Z	0,037(3)
Orientation préférentielle	
GI (100)	1,514(4)
Neutrons	
Diffractomètre	2-axes G4-1, LLB
Porte échantillon	Capillaire 8 mm
2θ (°)	$2\theta_{\min} = 7,02$; $2\theta_{\max} = 86,92$; $2\theta_{\text{step}} = 0,10$
m-CPPT β (Rietveld)	
Affinement	
Facteurs d'accord de profil (%)	$R_p = 3,06$, $R_{wp} = 4,17$, $R_{exp} = 2,63$, $\chi^2 = 2,51$
Facteurs d'accord de structure (%)	$R_{Bragg} = 6,38$; $R_F = 9,42$
No, de point de mesure	800
No, de réflexion	183

No, de paramètre affiné	30
No, of contrainte	0
Affinement des H	Indépendant

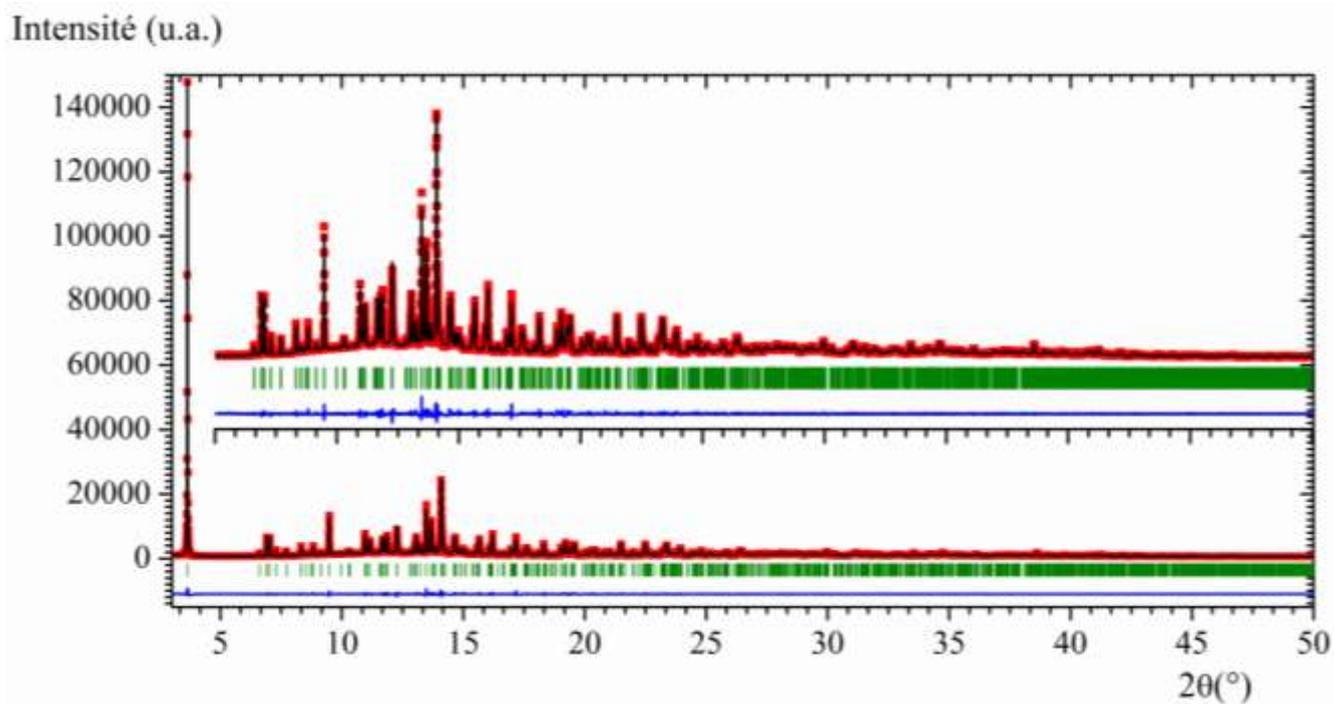


Figure III-20 : Diagramme Rietveld de la phase m-CPPT β par diffraction des rayons X synchrotron. Les données acquises sont représentées par des points rouges, le profil simulé par une ligne noire et la différence par une ligne bleue. Les barres verticales indiquent les positions des pics de Bragg. Le diagramme superposé correspond à un agrandissement du premier.

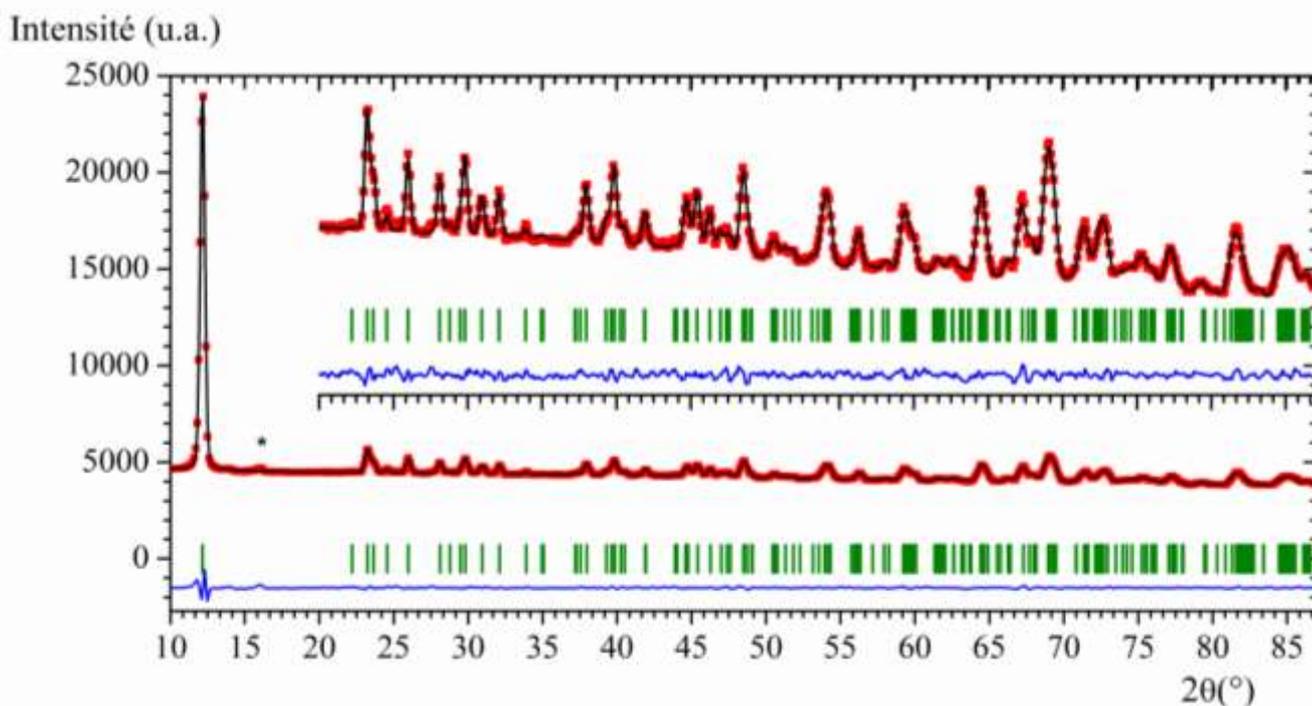


Figure III-21 : Diagramme Rietveld de la phase m-CPPT β par diffraction des neutrons. Les données acquises sont représentées par des points rouges, le profil simulé par une ligne noire et la différence par une ligne bleue. Les barres verticales indiquent les positions des pics de Bragg. Le diagramme superposé correspond à un agrandissement du premier et l'astérisque * correspond à la phase trihydratée u-CPP.

Les paramètres de maille sont sensiblement égaux à ceux déterminés par Balić-Žunić *et al.* et se rapprochent de ceux déterminés par DFT, avec 2,5% d'erreur maximale pour la valeur de b [Balić-Žunić *et al.*, 2000]. Les diagrammes ne présentent pas de différence majeure avec les profils simulés, un pic caractéristique de la phase trihydratée u-CPP est cependant visible sur le diagramme de diffraction des neutrons. Cette phase, issue de la déshydratation de la phase m-CPPT β dès 30°C, est formée en faible quantité dans le porte échantillon. L'acquisition a d'ailleurs été réalisée sans vide partiel durant l'acquisition contrairement aux autres phases pour éviter la conversion totale de la phase tétrahydratée en phase trihydratée. Les coordonnées atomiques et certains paramètres géométriques de la structure du m-CPPT β obtenue par affinement Rietveld sont reportés dans les tableaux III-21 et III-22.

Les positions atomiques affinées sont similaires à celles obtenues par DFT, avec un écart plus marqué pour l'atome d'oxygène de la molécule d'eau OW2, similaire à ce qui a été observé entre les simulations DFT et les données publiées par Balić-Žunić *et al.*

Tableau III-21 : Coordonnées atomiques de la structure m-CPPT β obtenue par affinement Rietveld et distances entre les positions atomiques de la structure obtenue et la structure DFT suivant a, b et c et distances totales (Å). Les distances sont établies sur la base de paramètres de maille égaux, correspondant à ceux de la structure établie par analyse Rietveld.

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	ΔX (Å)	ΔY (Å)	ΔZ (Å)	Δd_{X-X} (Å)
Ca1	0,4722(3)	0,0030(5)	0,7285(3)	0,002	0,025	0,048	0,062
Ca2	0,2591(3)	0,1518(5)	0,3211(4)	0,027	0,047	0,055	0,090
P1	0,7476(4)	0,0336(7)	0,9837(5)	0,001	0,035	0,050	0,071
P2	0,5633(4)	0,2539(7)	0,5173(5)	0,017	0,153	0,028	0,167
O1	0,4984(7)	0,2310(12)	0,1095(9)	0,131	0,100	0,183	0,289
O2	0,4615(7)	0,2415(11)	0,8694(8)	0,099	0,023	0,048	0,128
O3	0,6737(7)	0,0155(13)	0,8310(8)	0,086	0,044	0,045	0,121
O4	0,2077(7)	0,1520(12)	0,9594(8)	0,019	0,137	0,201	0,284
O5	0,6676(9)	0,1056(14)	0,0584(10)	0,216	0,054	0,080	0,264
O6	0,6356(8)	0,0637(14)	0,5242(9)	0,072	0,009	0,021	0,083
O7	0,8597(8)	0,1567(13)	0,0334(9)	0,197	0,184	0,071	0,304
OW1	0,2740(7)	0,0902(12)	0,6750(8)	0,113	0,078	0,012	0,143
OW2	0,8769(7)	0,0225(11)	0,6285(8)	0,084	0,317	0,390	0,598
OW3	0,0769(7)	0,1595(12)	0,1194(8)	0,041	0,075	0,011	0,090
OW4	0,8936(7)	0,1504(12)	0,3368(9)	0,045	0,029	0,178	0,205
H1	0,772(3)	0,502(4)	0,806(5)	0,17	0,07	0,04	0,20
H2	0,783(2)	0,617(4)	0,915(6)	0,05	0,19	0,08	0,23
H3	0,970(2)	-0,010(6)	0,648(3)	0,20	0,33	0,30	0,57
H4	0,124(3)	0,883(5)	0,408(7)	0,18	0,08	0,25	0,37
H5	0,089(3)	0,175(4)	0,041(4)	0,09	0,07	0,05	0,14
H6	-0,010(4)	0,127(4)	0,091(6)	0,04	0,13	0,02	0,15
H7	0,872(3)	0,213(3)	0,382(5)	0,06	0,22	0,08	0,28
H8	0,876(4)	0,202(3)	0,243(6)	0,03	0,00	0,14	0,16

Tableau III-22 : Paramètres géométriques sélectionnés (distances en Å et angles en °)

OW1 — H1	0,95(4)	OW3 — H5	0,92(5)
— H2	0,98(5)	— H6	1,02(5)
OW2 — H4	0,81(5)	OW4 — H7	0,79(5)
— H3	1,11(3)	— H8	1,03(6)
OW1 — H1 — H2 95(3)			
OW2 — H4 — H3 96(4)			
OW3 — H5 — H6 106(4)			
OW4 — H7 — H8 113(4)			

Les angles et les distances au sein des molécules d'eau sont de plus cohérents et forment au sein

de la structure un réseau similaire à celui observé dans le cas de la structure obtenue par modélisation *ab initio*. Cela confirme de plus la validité de la modélisation DFT.

(3) Structure de la phase m-CPPT β

Les affinements réalisés, de faible résolution, constituent cependant plus une validation du modèle théorique qu'une résolution complète de la structure. Ils fournissent cependant une approximation satisfaisante pour décrire la structure du réseau de liaisons hydrogène au sein de la phase m-CPPT β . La structure est représentée sur la figure III-22 et les paramètres de maille ainsi que les coordonnées atomiques sont reportés respectivement dans les tableaux III-23 et III-24.

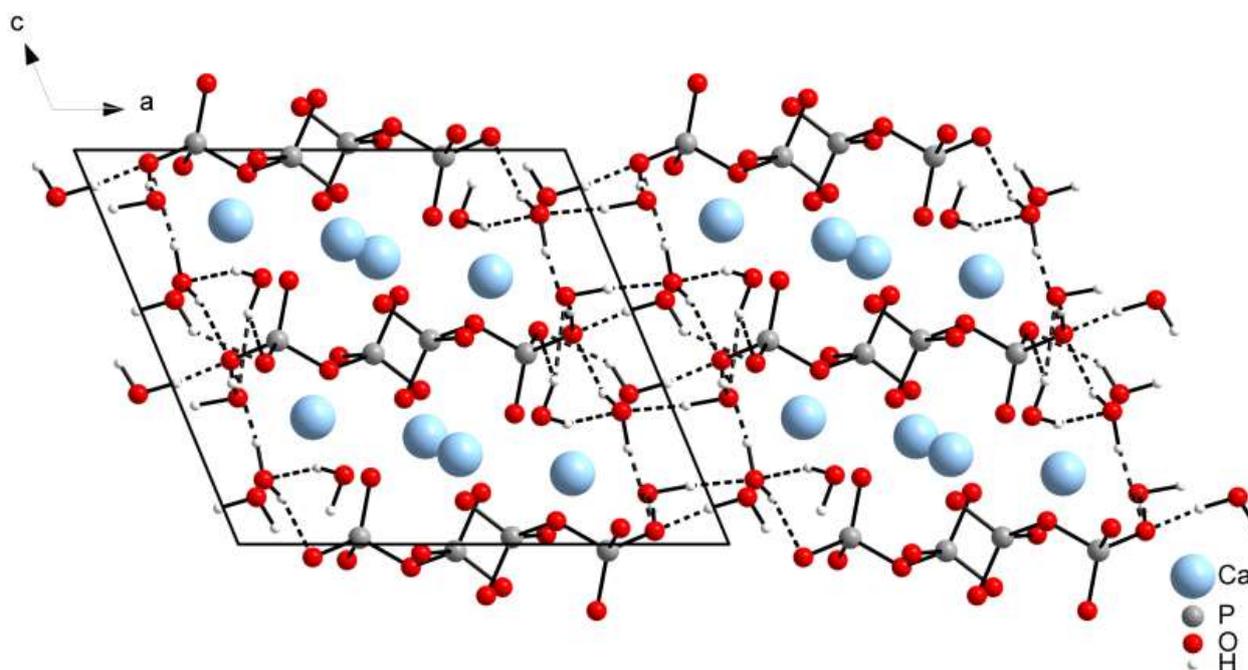


Figure III-22 : Structure de la phase m-CPPT β suivant l'axe [010] avec représentation des molécules de pyrophosphate et du réseau de liaisons hydrogène.

Tableau III-23 : Paramètres de maille de la structure m-CPPT β .

	Méthode	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
m-CPPT β	Mixte	12,3174(2)	7,5326(1)	10,7958(2)	90,00	112,437(2)	90,00

Tableau III-24 : Coordonnées atomiques et déplacements quadratiques moyens isotropes (\AA^2).

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U_{iso}^*/U_{eq}
Ca1	0,4722(3)	0,0030(5)	0,7728(3)	0,0344(9)
Ca2	0,2591(3)	0,1518(5)	0,3211(4)	0,0365(12)
P1	0,7476(4)	0,0336(7)	0,9837(5)	0,0467(12)
P2	0,5633(4)	0,2539(7)	0,5173(5)	0,0352(16)
O1	0,4984(7)	0,2310(12)	0,1095(9)	0,019(4)
O2	0,4615(7)	0,2415(11)	0,8694(8)	0,015(3)
O3	0,6737(7)	0,0155(13)	0,8310(8)	0,012(4)
O4	0,2077(7)	0,1520(12)	0,9594(8)	0,023(3)
O5	0,6676(9)	0,1056(14)	0,0584(10)	0,033(4)
O6	0,6356(8)	0,0637(14)	0,5242(9)	0,002(3)
O7	0,8597(8)	0,1567(13)	0,0334(9)	0,016(4)
OW1	0,2740(7)	0,0902(12)	0,6750(8)	0,014(3)
OW2	0,8769(7)	0,0225(11)	0,6285(8)	0,021(3)
OW3	0,0769(7)	0,1595(12)	0,1194(8)	0,044(3)
OW4	0,8936(7)	0,1504(12)	0,3368(9)	0,027(3)
H1	0,772(3)	0,502(4)	0,806(5)	0,063*
H2	0,783(2)	0,617(4)	0,915(6)	0,063*
H3	0,970(2)	-0,010(6)	0,648(3)	0,063*
H4	0,124(3)	0,883(5)	0,408(7)	0,063*
H5	0,089(3)	0,175(4)	0,041(4)	0,063*
H6	-0,010(4)	0,127(4)	0,091(6)	0,063*
H7	0,872(3)	0,213(5)	0,382(5)	0,063*
H8	0,876(4)	0,202(3)	0,243(6)	0,063*

* Les déplacements quadratiques moyens des atomes d'hydrogène sont fixés pour correspondre à ceux de la structure t-CPPD.

(4) Structures des dérivés de la phase m-CPPT β .

Au cours des différentes déshydratations de la phase m-CPPT β , plusieurs transitions de phase ont été observées. Afin de mieux comprendre les différentes étapes de ce processus qui sera étudié dans le chapitre IV, plusieurs structures ont été modélisées ou déterminées dont les phases trihydratée u-CPP et monohydratée m-CPPM.

Modélisation de la phase u-CPP

En l'absence de diagramme de diffraction de qualité suffisante pour une analyse Rietveld de la phase u-CPP, un modèle de structure a été simulé pour représenter cette phase.

Les paramètres de maille ont été déterminés par la méthode de Le Bail sur les diagrammes de diffraction des RX obtenus et présentés dans le chapitre IV. Une modélisation *ab initio* a ensuite été réalisée à partir de la structure de la phase m-CPPT β en retirant la molécule d'eau OW4, initialement

maintenue dans la structure uniquement par liaison hydrogène. La qualité de la modélisation a été réduite par rapport aux cas précédents, le but étant de comprendre l'évolution globale du système sans toutefois fournir un modèle structural équivalent à une résolution structurale complète. Ainsi les paramètres de maille n'ont pas été optimisés, et les critères de convergence ont été modifiés.

La modélisation *ab initio* a été réalisée via le logiciel Materials Studio version 7.0 avec les mêmes conditions que précédemment. L'échantillonnage de la zone de Brillouin considérée correspond à une grille de Monkhorst et Pack 1 x 2 x 1 [Monkhorst & Pack, 1976].

Les critères de convergence ont été fixés à $2 \cdot 10^{-5}$ Hartree pour l'énergie, 0,005 Å pour les déplacements et 0,002 Ha/Å pour la force subie. Les positions atomiques ont été affinées afin d'obtenir la structure la plus stable. La structure identifiée correspond à un minimum d'énergie, situé à -11174,18287 Hartrees dont -14,44200 Ha d'énergie de liaison. Les comparaisons avec les phases m-CPPT β , m-CPPD et t-CPPD, prises comme référence de phases hydratées, permettent de calculer l'énergie moyenne associée à la présence d'une molécule d'eau dans la structure. Cette énergie par molécule d'eau correspond à -305,7668 Ha entre m-CPPT β et u-CPP, -305,6414 Ha d'écart entre m-CPPT β et m-CPPD et -305,6218 Ha d'écart entre m-CPPT β et t-CPPD. Cette différence se retrouve dans l'énergie de liaison totale, avec des valeurs de -1,7631 Ha, -1,6399 Ha et -1,6180 Ha respectivement. On retrouve ainsi un écart d'énergie de liaison de 320 à 380 kJ.mol⁻¹ suivant la phase de référence. Soit par un calcul approximatif de l'énergie thermique avec force de rappel $E_{\text{therm}} = k_B T$, une énergie équivalente à une différence de température d'environ 40 K. On constate ainsi que la perte d'une molécule d'eau de m-CPPT β à u-CPP a un coût énergétique moindre que l'équivalent théorique de la perte d'une molécule d'eau entre m-CPPT β et les phases dihydratées (m-CPPD et t-CPPD). Cela pourrait expliquer la perte de cette molécule d'eau à température ambiante. La structure de la phase u-CPP est représentée sur la figure III-23 et les coordonnées atomiques correspondant sont reportées dans le tableau III-25.

Tableau III-25 : Coordonnées atomiques et déplacements quadratiques moyens isotropes (\AA^2).

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U_{iso}^*/U_{eq}
Ca1	0,4573	-0,0071	0,7325	0,016
Ca2	0,2503	0,1314	0,3250	0,019
O1	0,5023	0,2557	0,1230	0,013
O2	0,4606	0,2421	0,8731	0,010
O3	0,6768	-0,0037	0,8304	0,018
O4	0,1982	0,1583	0,9503	0,027
O5	0,6441	0,0794	0,0437	0,014
O6	0,6388	0,0738	0,5150	0,019
O7	0,8456	0,1700	0,0066	0,033
OW1	0,2394	-0,0689	0,6747	0,026
OW2	0,8957	0,1010	0,7028	0,045
OW3	0,0864	0,2378	0,1333	0,035
P1	0,7494	0,0169	0,9779	0,017
P2	0,5575	0,2379	0,5140	0,020
H1	0,2052	-0,1589	0,6027	0,063
H2	0,2120	-0,1139	0,7442	0,063
H3	0,8659	0,1848	0,6264	0,063
H4	0,9858	0,1009	0,7233	0,063
H5	0,0057	0,1781	0,0857	0,063
H6	0,1222	0,2594	0,0643	0,063

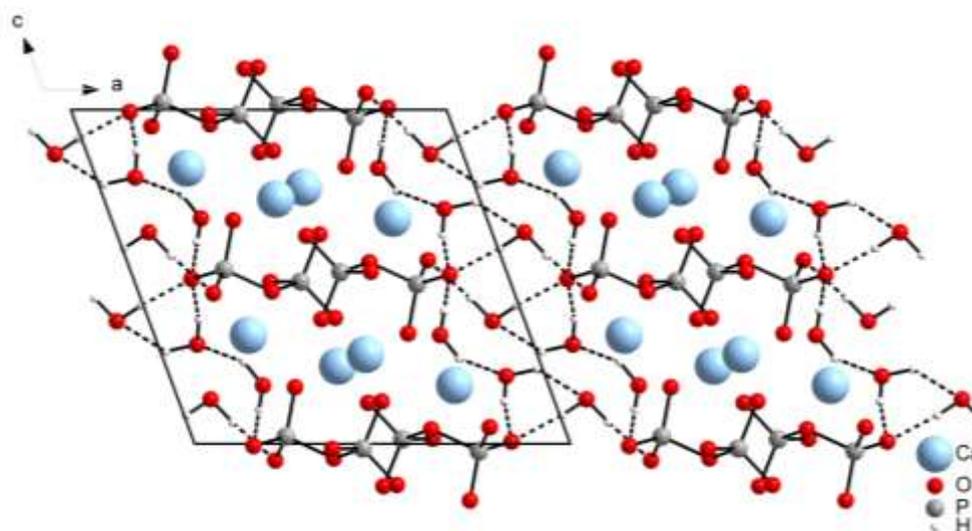


Figure III-23 : Structure de la phase u-CPP suivant l'axe [010] avec représentation des molécules de pyrophosphate et des liaisons hydrogène avec la dernière molécule d'eau.

La structure obtenue correspond à un composé trihydraté possédant toujours une alternance de molécules d'eau et groupements de pyrophosphate de calcium. Cette structure n'a cependant pas pu être observée.

Détermination de la structure de la phase m-CPPM

La structure de la phase monohydratée m-CPPM, issue de la déshydratation partielle de la phase m-CPPT β à approximativement 120°C, a été déterminée par diffraction des rayons X sur monocristal à partir d'un cristal obtenu par synthèse en gel (voir chapitre IV). La résolution de structure a été effectuée en collaboration avec Nicolas Ratel du Centre d'Elaboration de Matériaux et d'Etudes Structurales (CEMES, Toulouse) et Nathalie Saffon de la plateforme de diffraction des rayons X de l'Institut de Chimie de Toulouse. Les caractéristiques de l'acquisition des données sont récapitulées dans le tableau III-27. La structure est représentée sur la figure III-24 et les coordonnées atomiques sont reportées dans le tableau III-26.

 Tableau III-26 : Coordonnées atomiques et déplacements quadratiques moyens isotropes (\AA^2).

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U_{iso}^*/U_{eq}
O1	0,4356(5)	0,4417(6)	0,6198(4)	0,0238(10)
O2	0,6208(4)	0,2267(6)	0,5986(4)	0,0179(9)
O3	0,4099(4)	0,0743(6)	0,6350(4)	0,0205(10)
O4	0,3620(4)	0,2220(6)	0,4061(4)	0,0220(10)
O5	0,4312(5)	0,1701(7)	0,8751(4)	0,0304(11)
O6	0,3854(5)	-0,1793(7)	0,7846(5)	0,0282(11)
O7	0,6306(4)	-0,0269(7)	0,8522(4)	0,0235(10)
OW1	0,5937(5)	0,5446(9)	0,9158(5)	0,0264(11)
P1	0,45546(16)	0,2487(2)	0,56019(15)	0,0184(4)
P2	0,46790(17)	0,0080(2)	0,79898(15)	0,0200(4)
Ca1	0,70409(13)	0,51047(18)	0,74953(12)	0,0186(3)
Ca2	0,73672(14)	0,3039(2)	0,43544(13)	0,0242(4)
H1	0,572(10)	0,421(15)	0,905(9)	0,05(3)
H2	0,526(13)	0,631(19)	0,885(12)	0,10(4)

 Paramètres de déplacement atomique (\AA^2)

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{12}	U^{13}	U^{23}
O1	0,023(2)	0,022(2)	0,018(2)	0,0011(19)	-0,0002(19)	-0,0022(19)
O2	0,018(2)	0,019(2)	0,0101(19)	0,0007(17)	-0,0011(17)	0,0001(17)
O3	0,021(2)	0,021(2)	0,011(2)	-0,0021(19)	-0,0020(17)	-0,0002(18)
O4	0,020(2)	0,024(3)	0,012(2)	0,0000(19)	-0,0039(17)	0,0001(18)
O5	0,033(3)	0,035(3)	0,017(2)	0,005(2)	0,005(2)	-0,003(2)
O6	0,024(2)	0,026(3)	0,024(2)	-0,005(2)	-0,0012(19)	0,001(2)
O7	0,016(2)	0,033(3)	0,013(2)	0,0016(19)	-0,0030(17)	0,0048(19)
OW1	0,023(3)	0,030(3)	0,017(2)	0,000(2)	-0,0017(19)	-0,004(2)
P1	0,0146(8)	0,0196(8)	0,0115(7)	-0,0007(7)	-0,0041(6)	-0,0011(6)
P2	0,0166(8)	0,0233(9)	0,0135(8)	-0,0003(7)	-0,0003(6)	-0,0004(7)
Ca1	0,0163(6)	0,0191(7)	0,0126(6)	-0,0009(5)	-0,0020(5)	-0,0005(5)
Ca2	0,0192(6)	0,0315(8)	0,0141(6)	0,0024(6)	-0,0008(5)	-0,0004(6)

Tableau III-27 : Paramètres de résolution de la structure de la phase m-CPPM par diffraction des RX sur monocristal

m-CPPM (Monocristal)

Données cristallographique	
Formule chimique	Ca ₂ P ₂ O ₇ ·H ₂ O
M_r	277,12
Système cristallin, Groupe d'espace	Monoclinique, $P2_1/n$
Température (K)	180
a, b, c (Å)	10,16 (14) ; 6,97 (5) ; 10,77 (10)
β (°)	114,4 (4)
V (Å ³)	695 (12)
Z	4
$F(000)$	544
D_x (Mg m ⁻³)	2,602
Radiation type	Mo $K\alpha$
No. of reflections for cell measurement	1804
θ range (°) for cell measurement	3.7–27.8
μ (mm ⁻¹)	2,11
Forme du cristal	Plaquette
Taille du cristal (mm)	0,2 × 0,03 × 0,02
Acquisition des données	
Diffractomètre	Bruker APEX-II diffractomètre
Correction d'absorption	Multi-scan SADABS
No. de réflexions mesurées, indépendantes et observées [$I > 2\sigma(I)$]	7104, 1402, 991
R_{int}	0,059
θ (°)	$\theta_{max} = 26,4$, $\theta_{min} = 5,3$
$(\sin \theta/\lambda)_{max}$ (Å ⁻¹)	0,625
Domaine de h, k et l	$h = -13 \rightarrow 13$, $k = -8 \rightarrow 9$, $l = -14 \rightarrow 14$
Affinement	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$, $wR(F^2)$, S	0,051 ; 0,133 ; 1,06
No. de réflexions	1402
No. de paramètres	117
No. de contraintes	0
Affinement des hydrogènes	All H-atom parameters refined
Pondération	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0568P)^2 + 4,0066P]$ où $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
$\Delta\rho_{max}$, $\Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	0,89 –0,69

La structure en couche est conservée bien que les molécules d'eau OW2, OW3 et OW4 aient été

libérées. L'espace ainsi libéré a été comblé par la liaison Ca2-O5 formant ainsi un polyèdre déformé à la fois pour l'environnement de Ca2 et de P2. A l'inverse, les environnements des atomes P1 et Ca1, situés à l'intérieur des couches de pyrophosphates de calcium, ne sont que légèrement influencés.

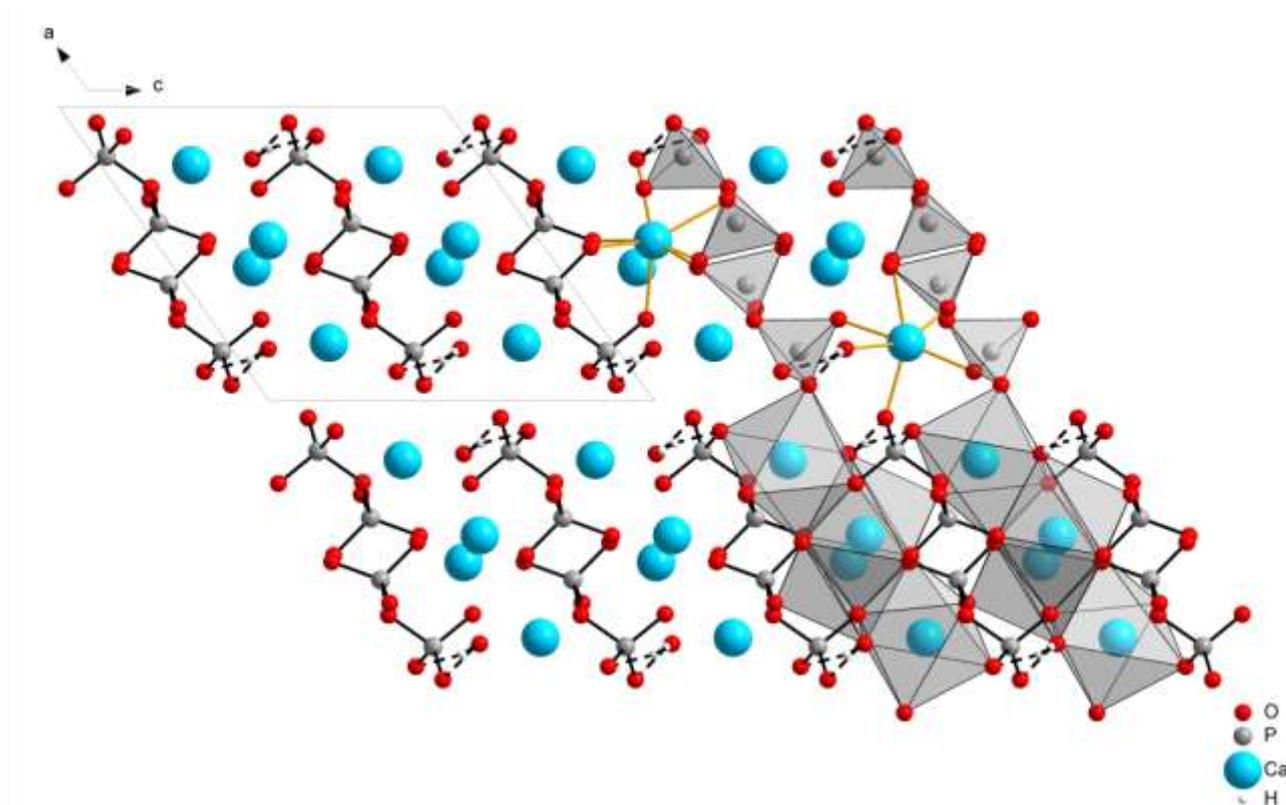


Figure III-24 : Structure de la phase m-CPPM suivant l'axe [010] avec représentation des molécules de pyrophosphate et des liaisons hydrogène avec la dernière molécule d'eau.

L'étude de la phase m-CPPT β et de ses phases associées représentent une étape importante dans la compréhension des phénomènes se produisant lors de la déshydratation de certains composés de pyrophosphate de calcium, dont les phases amorphes, en permettant l'étude de l'hydrolyse de la molécule de pyrophosphate décrite dans le chapitre IV.

A2 d) Analyse de la phase amorphe a-CPP par diffusion des rayons X.

Afin de fournir la description la plus complète possible des phases de pyrophosphate de calcium hydraté, une étude de la phase amorphe a-CPP a été entreprise. Cette phase pourrait correspondre au premier stade d'une évolution vers les phases cristallisées identifiées dans les articulations de patients malades [McCarty *et al.*, 1966]. Cette évolution, bien que décrite *in vitro*, n'a pas pu être observée *in vivo* notamment par manque de moyen de caractérisation et de diagnostique adapté à la détection de la phase a-CPP dans les différents spécimens de cartilages ou de fluides synoviaux [Brown *et al.*, 1963; Liu *et al.*, 2009]. L'étude de la phase amorphe présentée ici s'appuie notamment sur la diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS) pour définir l'organisation locale de la matière et la comparer aux phases cristallisées de CPP d'intérêt biologique.

(1) Données bibliographiques [Slater *et al.*, 2011]

La phase a-CPP a été étudiée par Slater *et al.* par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS). Cette structure s'est révélée particulièrement stable en solution par rapport aux phases amorphes de phosphate de calcium ou de carbonate de calcium, elles aussi d'intérêt biologique. Cette stabilité a été associée à la présence de liaison métal-eau et à la configuration de la molécule de pyrophosphate, dont la taille et la flexibilité pourrait inhiber la cristallisation.

La structure locale de la phase amorphe a été décrite en termes de distances interatomiques issues de l'étude des fonctions de distributions de paires. Ces distances ont été reprises dans le tableau III-28.

Tableau III-28 : Distances interatomiques (Å) et attributions, repris de Slater *et al.* [Slater *et al.*, 2011]. Erreur estimée ~0,02 Å

	P-O	Ca-O	P-P	Ca-P
a-CPP	1,53	2,43; 3,56; 4,47	2,99	3,56
m-CPPT β	1,54	2,41; 3,56; 4,50	3,06	3,48

La phase amorphe a ainsi été décrite comme proche, par son organisation locale, de la phase cristallisée m-CPPT β dont elle partage le degré d'hydratation avec une formule $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ avec $3,8 < n < 4,2$.

La partie suivante portera sur la comparaison de cette organisation avec les autres phases de pyrophosphate de calcium hydraté, m-CPPD et t-CPPD, afin de mieux appréhender les évolutions

possibles de la phase amorphe *in vitro* mais aussi *in vivo*.

(2) Diffusion des rayons X aux grands angles

La diffusion des rayons X aux grands angles a été réalisée en collaboration avec Nicolas Ratel et Pierre Lecante du Centre d'Elaboration de Matériaux et d'Etudes Structurales (CEMES) de Toulouse. La mesure a été réalisée sur un appareil élaboré au CEMES de type LASIP dont la géométrie en transmission est conçue pour minimiser les phénomènes de diffusion parasite [Lecante *et al.*, 1985]. La longueur d'onde utilisée est celle produite par une anticathode en Molybdène et l'intensité est collectée par un détecteur de type SDD. 457 intensités ont été collectées sur un domaine $0^\circ < 2\theta < 130^\circ$ avec un pas de $\Delta Q = 0,035 \text{ \AA}^{-1}$. L'échantillon est introduit en capillaire pour la mesure. La mesure est ensuite corrigée (correction de la diffusion du capillaire et de l'air) par la soustraction d'un blanc puis corrigée pour éliminer les effets de la polarisation et de l'absorption de l'échantillon et enfin analysée par le logiciel LASIP [Lecante *et al.*, 1985]. Les fonctions de distributions de paires (PDF) partielles utilisées afin d'attribuer les distances interatomiques observées ont été calculées en utilisant le logiciel PDFgui2 à partir des structures cristallines de t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT [Farrow *et al.*, 2007].

(3) Fonctions de distribution radiale de CPP

Les fonctions de distributions radiales (RDF) des pyrophosphates de calcium hydratés étudiés, a-CPP, m-CPPT β , m-CPPD et t-CPPD, sont présentées sur la figure III-25.

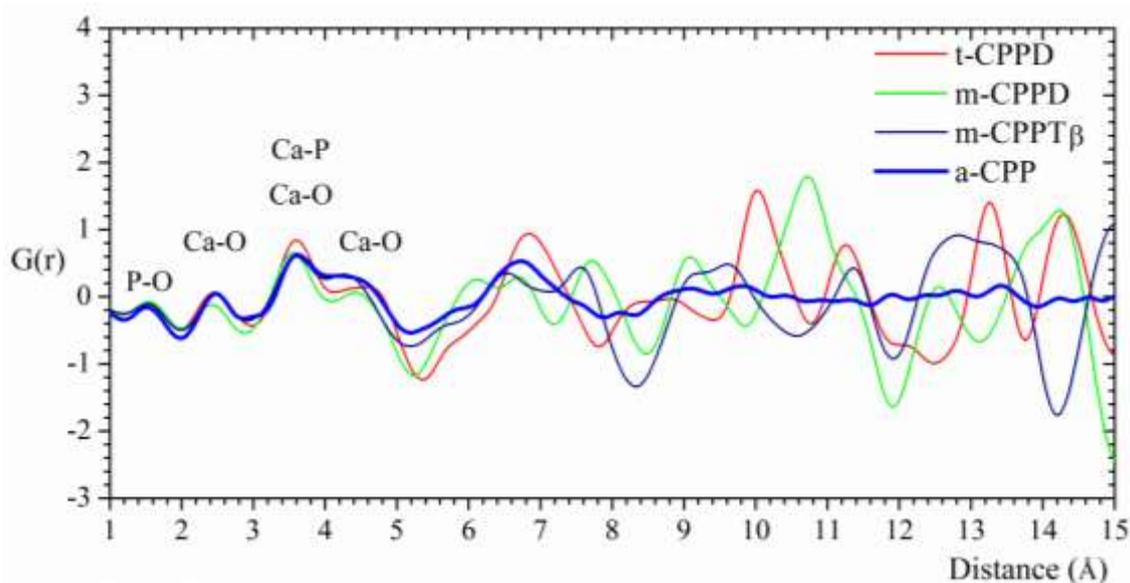


Figure III-25 : Fonctions de distribution radiale des phases de CPP et les attributions des distances interatomiques.

La phase amorphe a-CPP présente une perte d'ordre à longue distance, au-delà de 7,5 Å, caractéristique des phases désordonnées, tandis que les RDF des phases cristallisées sont toujours intenses avec l'apparition de l'ordre cristallin. De plus, l'organisation à courte distance de la phase a-

CPP semble plus proche de la phase m-CPPT β que des autres phases de pyrophosphate de calcium hydratées sur l'ensemble de son domaine de cohérence. L'ordre au-dessous de 4,5 Å est régi par l'organisation locale des phosphates et est similaire à celui des phases d'orthophosphates de calcium simulées, brushite et hydroxyapatite. La résolution des mesures ne nous permettent pas de détecter le groupe P-P caractéristique des pyrophosphates à 3 Å.

Ce résultat confirme l'étude de Slater *et al.* et l'étend aux autres phases hydratées de pyrophosphate de calcium, montrant une similitude entre l'organisation de la phase a-CPP et m-CPPT β . Cette similitude sera explorée dans le chapitre IV au travers d'une étude sur l'évolution de la phase amorphe par microscopie électronique. Elle renforce aussi l'importance de l'étude de la phase m-CPPT β comme modèle pour le comportement des phases désordonnées de pyrophosphate de calcium à courte échelle. Réciproquement, l'organisation de l'unité formulaire observée pour m-CPPD et t-CPPD ne correspondrait pas à celle du cluster de l'amorphe, malgré la diversité de structures adoptant cette organisation.

Une étude de modélisation *ab initio* corrélée à la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire de la phase amorphe a de plus été débuté en collaboration avec Jincheng Du du Center for Advanced Scientific Computing and Modeling (CASCaM) - Materials Science and Engineering department de l'University of North Texas (USA) et Christian Bonhomme du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris. Celle-ci permettra sans doute de définir un cluster pour le pyrophosphate de calcium amorphe afin de mieux comprendre sa stabilité exceptionnelle.

B. Analyses spectroscopiques des phases de CPP

Des analyses spectroscopiques complémentaires par spectroscopies Raman, infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) basse température et spectroscopie par résonance magnétique nucléaire ont été réalisées afin de décrire les systèmes étudiés plus précisément et fournir ainsi des outils complémentaires de caractérisation et de diagnostic de ces phases d'intérêt biologique. Ces analyses poursuivent les objectifs des caractérisations du chapitre II tout en complétant les résultats des analyses structurales obtenues par diffraction. Les différentes caractérisations présentées ont été complétées par des modélisations *ab initio* afin d'améliorer la compréhension des résultats.

B1. Spectroscopies Raman et FTIR basse température

De part leur rapidité d'analyse et leur coût relativement bas, ces spectroscopies constituent des outils de caractérisation et de diagnostic pouvant être utilisés couramment pour l'analyse des pyrophosphates de calcium. Les spectres des différentes phases ont déjà été présentés dans le chapitre II montrant les différences entre chacune d'entre elles facilitant leur identification. Cette partie s'attachera à identifier plus précisément les vibrations associées à chaque bande identifiable afin de réaliser une attribution fine du spectre.

(1) Bandes caractéristiques de vibration des phases de CPP

Comme nous l'avons signalé au chapitre II, l'étude des bandes de vibration et notamment le schéma de corrélation et l'analyse vibrationnelle de la structure de la phase t-CPPD ont été réalisés par Cornilsen [Cornilsen, 1984]. Le spectre de la structure du t-CPPD contient un total de 102 modes (51 A_g et 51 A_u), dont 42 sont attribués aux ions pyrophosphate : 21 modes actifs en spectroscopie Raman et 21 modes actifs en infrarouge. Cependant, à température ambiante, toutes les bandes ne peuvent pas être attribuées et les domaines correspondant à chaque groupement (P-O, P-O-P, O-H) ont été divisés d'après les observations expérimentales. Ainsi huit modes d'élongation P-O peuvent être identifiés correspondant aux vibrations de la molécule libre, dans l'ordre de nombre d'onde suivant : $4 \nu^{as}_{PO_4} > \nu^s_{PO_4} > \nu^{as}_{PO_4} > \nu^{as}_{POP} > \nu^s_{POP}$. Cette première analyse a permis, par analogie entre les phases de CPP, l'attribution des différentes vibrations reportée dans le chapitre II.

Nous proposons ici une analyse complète des schémas de corrélation et le résumé des analyses des groupes facteur des trois phases cristallines : t-CPPD déjà décrite mais également m-CPPD et m-CPPT β non décrites par Cornilsen, regroupés dans les tableaux III-29 a et b. Ces analyses sont basées sur les structures des phases de CPP déterminées précédemment et permettront l'analyse complète du spectre de vibration en estimant le nombre de modes par groupement.

Tableau III-29 : Schéma de corrélation et analyses vibrationnelles des structures t-CPPD, m-CPPD et m-CPPT β .

a) Analyse vibrationnelle dans la structure t-CPPD

Symétrie de l'ion libre	Symétrie du site	Groupe facteur
C_{2v}	C_1	C_i
7 A_1 (IR, Raman)	21 A	21 A_g (Raman) 21 A_u (IR)
4 A_2 (Raman)		
6 B_1 (IR, Raman)		
4 B_2 (IR, Raman)		

Groupe facteur C_i	1 $P_2O_7^{4-}$ - site C_1		2 H_2O - site C_1		2 Ca^{2+} site C_1	Modes optiques	Modes acoustiques
	Int.	Ext.	Int.	Ext.			
A_g	21	3T, 3L	2×3	$2 \times (3T, 3L)$	$2 \times 3T$	51	0
A_u	21	3T, 3L	2×3	$2 \times (3T, 3L)$	$2 \times 3T$	48	3
Modes actifs	42	6T, 6L	12	12T, 12L	12 T	99	3

T : translation, L : libration, Int : interne, Ext. : externe

b) Analyse vibrationnelle dans les structures m-CPPD et m-CPPT β

Symétrie de l'ion libre	Symétrie du site	Groupe facteur
C_{2v}	C_1	C_{2h}
7 A_1 (IR, Raman)	21 A	21 A_g (Raman)
4 A_2 (Raman)		21 B_g (Raman)
6 B_1 (IR, Raman)		21 A_u (IR)
4 B_2 (IR, Raman)		21 B_u (IR)

m-CPPD

Groupe facteur C_{2h}	1 $P_2O_7^{4-}$ - site C_1		2 H_2O - site C_1		2 Ca^{2+} site C_1	Modes optiques	Modes acoustiques
	Int.	Ext.	Int.	Ext.			
A_g	21	3T, 3L	2×3	$2 \times (3T, 3L)$	$2 \times 3T$	51	0
B_g	21	3T, 3L	2×3	$2 \times (3T, 3L)$	$2 \times 3T$	51	0
A_u	21	3T, 3L	2×3	$2 \times (3T, 3L)$	$2 \times 3T$	50	1
B_u	21	3T, 3L	2×3	$2 \times (3T, 3L)$	$2 \times 3T$	49	2
Modes actifs	84	12T, 12L	24	24T, 24L	24 T	201	3

m-CPPT β

Groupe facteur C_{2h}	1 $P_2O_7^{4-}$ - site C_1		4 H_2O - site C_1		2 Ca^{2+} site C_1	Modes optiques	Modes acoustiques
	Int.	Ext.	Int.	Ext.			
A_g	21	3T, 3L	4×3	$4 \times (3T, 3L)$	$2 \times 3T$	69	0
B_g	21	3T, 3L	4×3	$4 \times (3T, 3L)$	$2 \times 3T$	69	0
A_u	21	3T, 3L	4×3	$4 \times (3T, 3L)$	$2 \times 3T$	68	1
B_u	21	3T, 3L	4×3	$4 \times (3T, 3L)$	$2 \times 3T$	67	2
Modes actifs	84	12T, 12L	48	48T, 48L	24 T	273	3

T : translation, L : libration, Int : interne, Ext. : externe

(2) Spectroscopie FTIR basse température

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en transmission a été réalisée à 105 (± 3) K dans une enceinte cryogénique adaptée au spectromètre infrarouge à transformée de Fourier ThermoElectron modèle Nicolet 5700 du laboratoire CIRIMAT. Les données ainsi obtenues possèdent une meilleure résolution de bande notamment dans les domaines de vibration des molécules d'eau et des phosphates et permettent ainsi une meilleure attribution de ces bandes caractéristiques des groupements phosphates (figures III-26 et III-27).

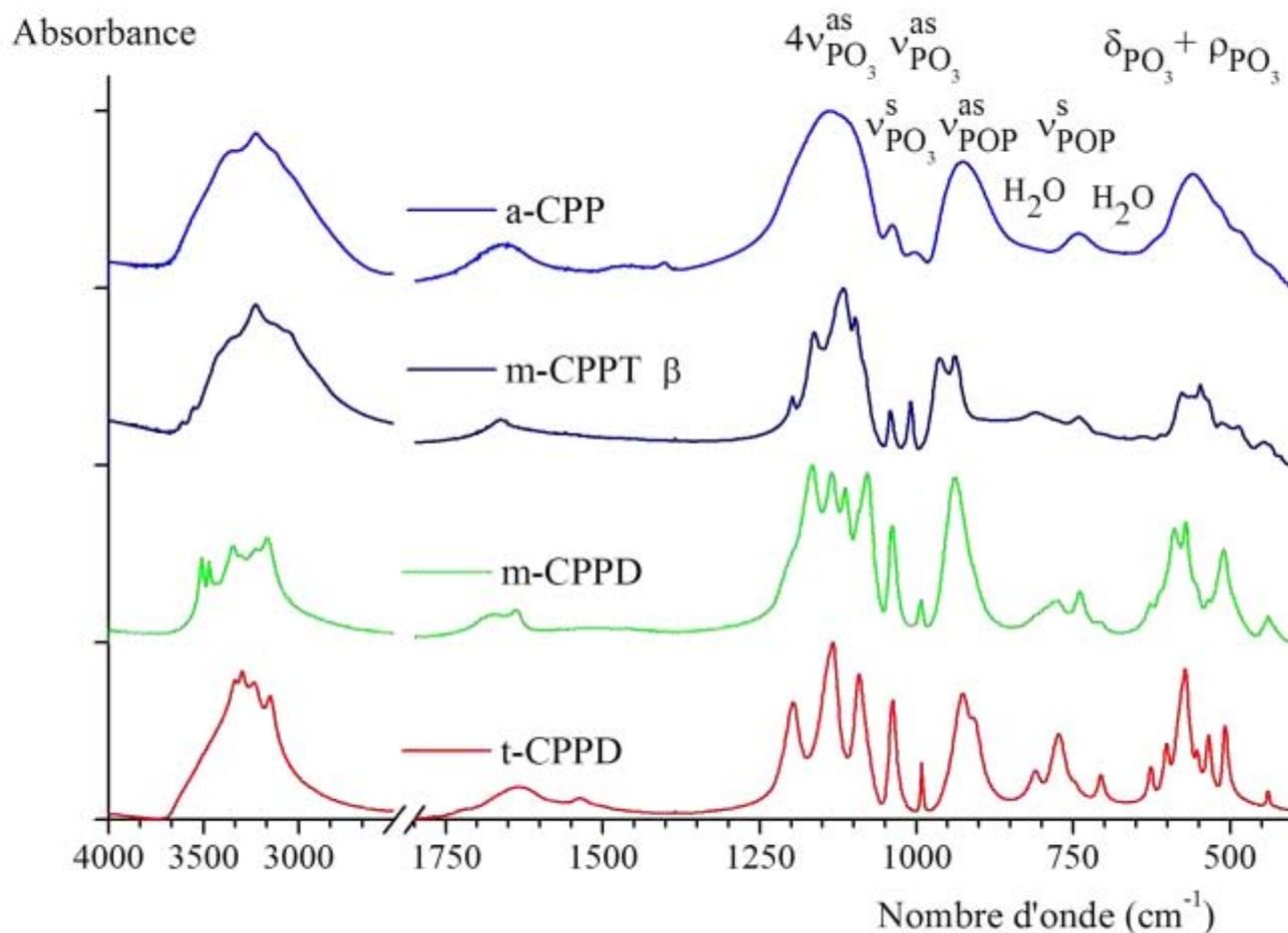


Figure III-26 : Spectres FTIR basse température (105 K) des phases de CPP et les attributions des bandes phosphates.

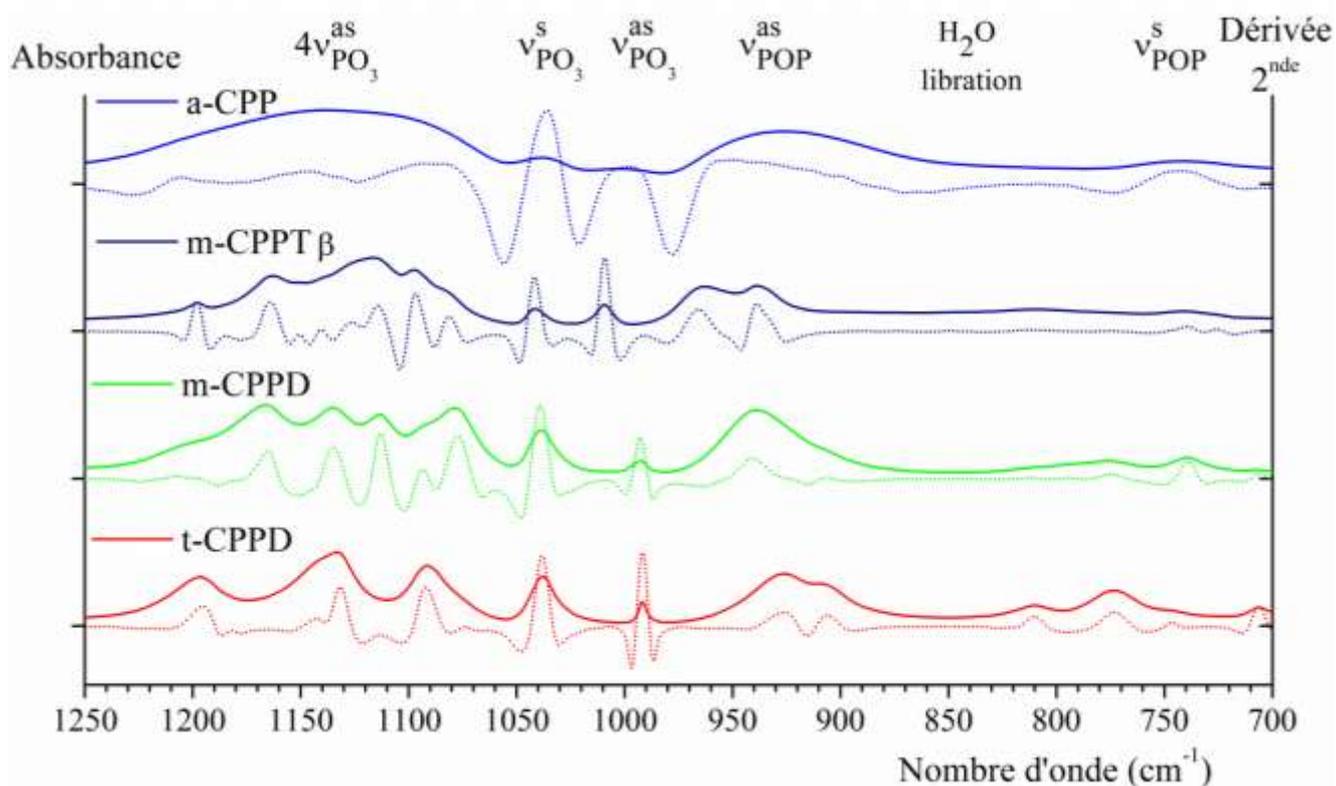


Figure III-27 : Spectres FTIR basse température (105 K) des phases de CPP dans le domaine 1250-700 cm^{-1} et les attributions des bandes phosphates. Les dérivées secondes des signaux sont tracées en pointillés.

La meilleure résolution observée par spectroscopie FTIR basse température est attribuée à une plus grande précision sur le nombre de bandes observables par spectre. Des épaulements sur les bandes principales, notamment sur la bande située à 1080 cm^{-1} , apparaissent ainsi dans le domaine $1300\text{-}850 \text{ cm}^{-1}$ attribué aux vibrations de la molécule de pyrophosphate, par rapport aux données acquises à température ambiante (figure II-3). Ces vibrations supplémentaires posent ainsi la question de leurs attributions, celles effectuées par Cornilsen sur la base de la molécule libre ne suffisant plus à décrire l'ensemble du spectre. Ces attributions pourront se faire non seulement par groupement structurel moléculaire mais également par analyse du groupe facteur complet en associant une vibration à une liaison particulière entre deux atomes identifiés dans la structure cristalline.

- *Simulations ab initio à partir des spectres FTIR basse T*

Afin de poursuivre ce travail d'attribution des bandes, des simulations *ab initio* ont été réalisées. Les spectres vibrationnels sont calculés en utilisant la théorie de la perturbation de la fonctionnelle de la densité (DFPT). Cette théorie, proche de la DFT, s'appuie sur la minimisation des perturbations de second ordre de l'énergie totale, soit la dérivée seconde de cette énergie, pour calculer les fréquences de vibration. La matrice Hessienne pondérée en masse, matrice de dérivée seconde de l'énergie, est en effet directement reliée aux fréquences de vibration. Formellement, les fréquences de vibration sont égales aux racines carrées des valeurs propres de la matrice Hessienne. Les intensités sont quant à

elles calculées à partir des tenseurs de polarisabilité atomique ou charges effectives de Born.

Ces simulations ont été effectuées comme précédemment via le logiciel Materials Studio version 7.0 en utilisant le module CASTEP. Les calculs ont été effectués en utilisant l'approximation des gradients généralisés, ou fonctionnelle d'échange non-locale, issue de la corrélation de Perdew-Burke-Ernzerh (GGA-PBE) [Perdew *et al.*, 1996]. Les propriétés sont calculées au point Γ de la zone de Brillouin et les orbitales des électrons de cœur ont été simulées par un pseudo-potential à norme conservée.

Les critères de convergence ont été fixés pour une qualité intermédiaire en raison du temps de calcul nécessaire avec des critères de convergence à $2 \cdot 10^{-5}$ Hartrees pour l'énergie, 0,002 Å pour les déplacements et 0,002 Ha/Å pour la force subie. Les spectres ont été réalisés sur des structures intermédiaires dont seules les positions atomiques ont été affinées, pour des contraintes de temps de calcul. Les spectres simulés représentent des intensités brutes ne prenant pas en compte les contributions instrumentales ou de taille et de forme des cristaux utilisés lors de l'expérience [Balan *et al.*, 2001]. Ainsi, seule l'aire totale des bandes simulées est à prendre en compte afin d'établir des comparaisons avec les valeurs expérimentales (figure III-28).

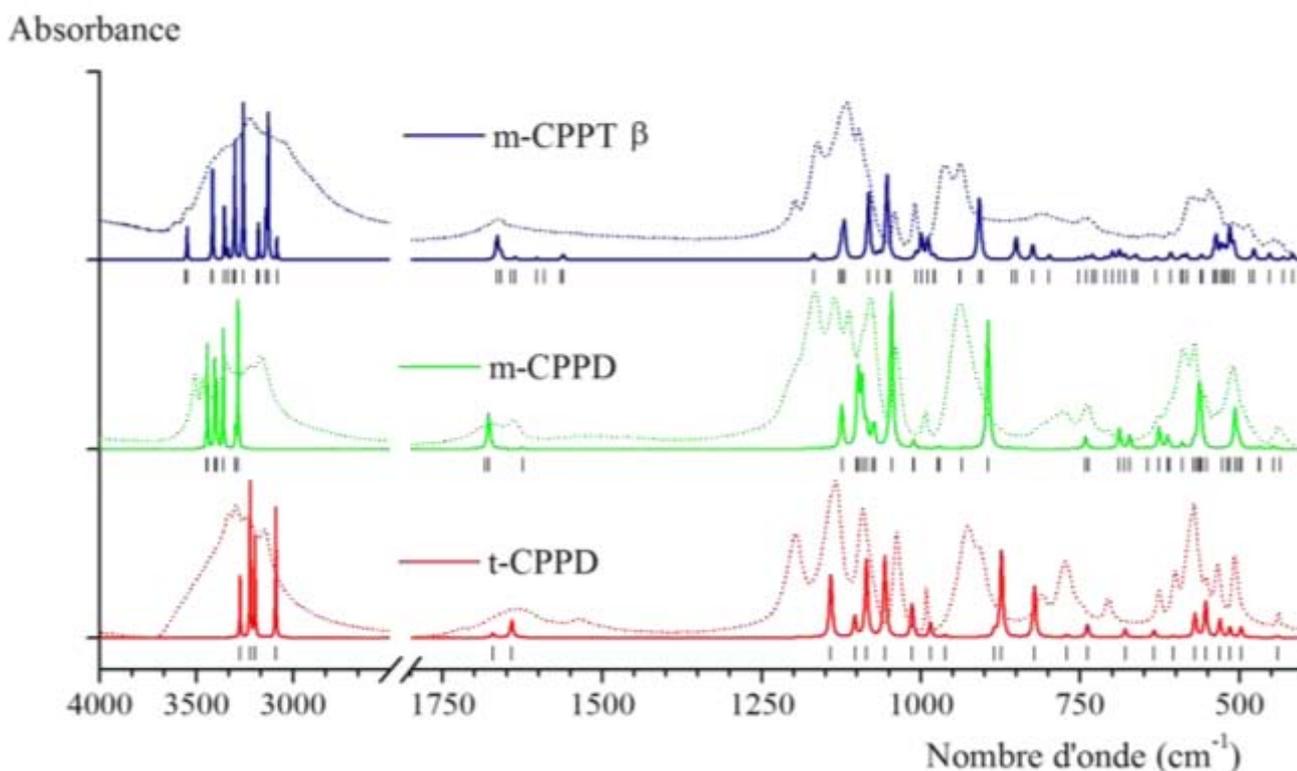


Figure III-28 : Spectres FTIR simulés (continus) et expérimentaux basse température (points) des phases de CPP. Les repères noirs représentent les fréquences théoriques des bandes associées.

Les spectres simulés reproduisent en partie les spectres obtenus expérimentalement, avec des décalages correspondant à ceux classiquement observés avec la théorie DFPT de l'ordre de 20 à 50

cm^{-1} [Balan *et al.*, 2001]. Même si des différences subsistent, les données simulées, en considérant l'ordre des fréquences et des intensités par groupement, sont suffisamment cohérentes avec les mesures expérimentales pour attribuer les différentes bandes aux vibrations moléculaires associées, et surtout pour définir le nombre maximal de bandes dans un domaine donné ainsi que l'ordre des fréquences de chacune des bandes d'attribution. Les fréquences correspondent à celles observées à température ambiante, n'indiquant pas de transition à basse température.

Les données issues des modélisations sont récapitulées dans le tableau III-30. Les différents modes des phases de CPP ont été analysés en fréquence et en intensité. Seuls les modes les plus intenses en spectroscopie FTIR, représentés sur les spectres simulés, donc d'intensité supérieure à 1 u.a., ont été reportés parmi les 102 modes totaux simulés pour t-CPPD, 204 modes pour m-CPPD et 276 modes pour m-CPPT β . Une illustration des modes de vibration moléculaire du m-CPPD à différentes fréquences est présentée figure III-33.

En plus de permettre une attribution plus claire des fréquences de vibration, les modélisations permettent de visualiser la vibration correspondante pour vérifier le caractère symétrique ou antisymétrique de la déformation associée. Les modélisations balayent ainsi une large gamme d'énergies de vibration, des vibrations de réseau aux élongations des molécules d'eau. On remarque ainsi que l'alternance observée par Cornilsen entre élongations symétriques et asymétriques $4 \nu^{\text{as}}_{\text{PO}_4} > \nu^{\text{s}}_{\text{PO}_4} > \nu^{\text{as}}_{\text{PO}_4}$ est nuancée dans les simulations, les fréquences des élongations symétriques étant toujours plus faibles que les antisymétriques.

Tableau III-30 : Position des bandes de vibration (cm^{-1}) et leur attribution pour les composés m-CPPD, t-CPPD et m-CPPT β d'après les modélisations DFPT de spectre FTIR.

t-CPPD		m-CPPT β		m-CPPD		Assignement.
Fréquence (cm^{-1})	Intensité (u.a.)	Fréquence (cm^{-1})	Intensité (u.a.)	Fréquence (cm^{-1})	Intensité (u.a.)	
739	7	731	6	737	1	ν^s_{POP}
			6	742	10	
771	2	799	19			H ₂ O Lib.
822	28	824	29			
		850				
873	47	905	11	894	103	$\nu^{\text{as}}_{\text{POP}}$
		909	75			
885	4	938	1			H ₂ O Lib.
962	2	979	5	970	2	$\nu^{\text{as}}_{\text{POP}}/\nu^s_{\text{PO}_4}$
985	8	989	27	1011	5	$\nu^s_{\text{PO}_4}$
1014	18	999	31	1011	2	
1056	44	1053	107	1046	126	$\nu^{\text{as}}_{\text{PO}_4}$
1085	42	1066	7	1073	12	
1104	11	1082	85	1076	12	
1141	34	1120	43	1085	16	
		1124	25	1092	50	
		1168	8	1098	59	
				1124	35	
1641	10	1561	7	1679	29	δ_{HOH}
1671	3	1659	8			
		1665	30			
3091	70	3084	18	3286	120	ν_{OH}
3198	55	3085	11	3300	16	
3223	84	3130	185	3362	85	
3275	33	3140	57	3363	15	
		3180	47	3397	51	
		3259	163	3406	69	
		3260	43	3443	76	
		3303	149	3446	15	
		3309	11			
		3339	12			
		3356	67			
		3417	115			
		3548	42			

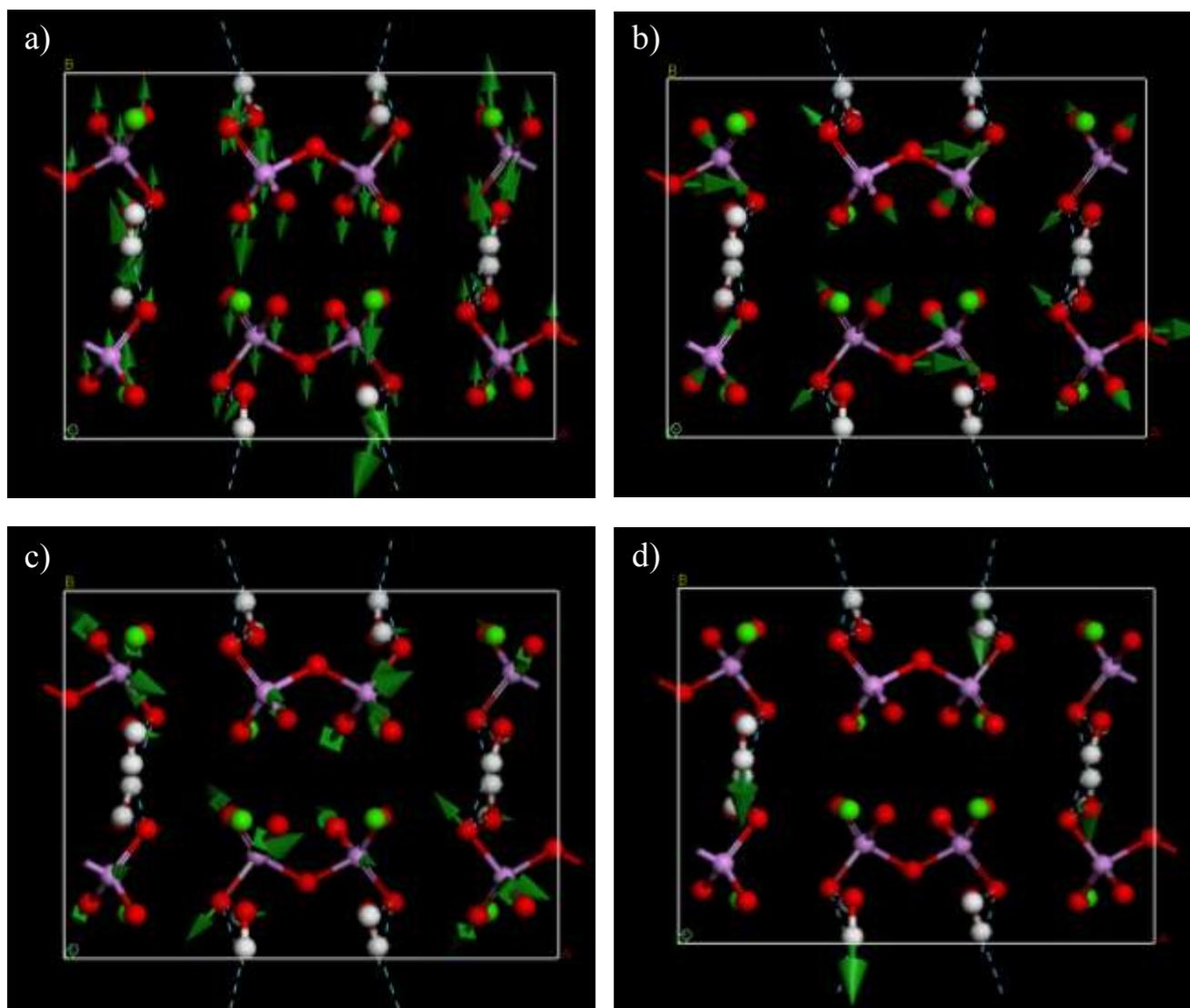


Figure III-29 : Modélisation des vibrations moléculaires de m-CPPD à différentes fréquences :
 a) 19 cm^{-1} vibration de réseau, b) 970 cm^{-1} vibration P-O-P, c) 1046 cm^{-1} vibration P-O et d) 3285 cm^{-1} vibration O-H

A partir de ces données, des décompositions du spectre total peuvent être effectuées afin, par exemple, de permettre la quantification de ces phases par spectroscopie infrarouge au cours d'une réaction par exemple. Remarquons cependant que si le profil après décomposition du spectre correspond globalement au spectre expérimental, certaines différences sont à observer (figure III-30). L'élongation de la liaison P-O-P $\nu^{\text{as}}_{\text{POP}}$ est ainsi modélisée par une fréquence à 894 cm^{-1} dans notre modèle contre deux fréquences observées dans des domaines similaires, $911\text{-}940\text{ cm}^{-1}$, expérimentalement (figure III-30). Ces différences pourraient provenir de phénomène plus complexe non modélisés (harmoniques, combinaisons, résonance de Fermi ou inversion doubling). Une étude du modèle structural, notamment de la géométrie de la molécule de pyrophosphate et des molécules d'eau proches, pourrait améliorer à la fois le modèle structural et l'étude du spectre FTIR.

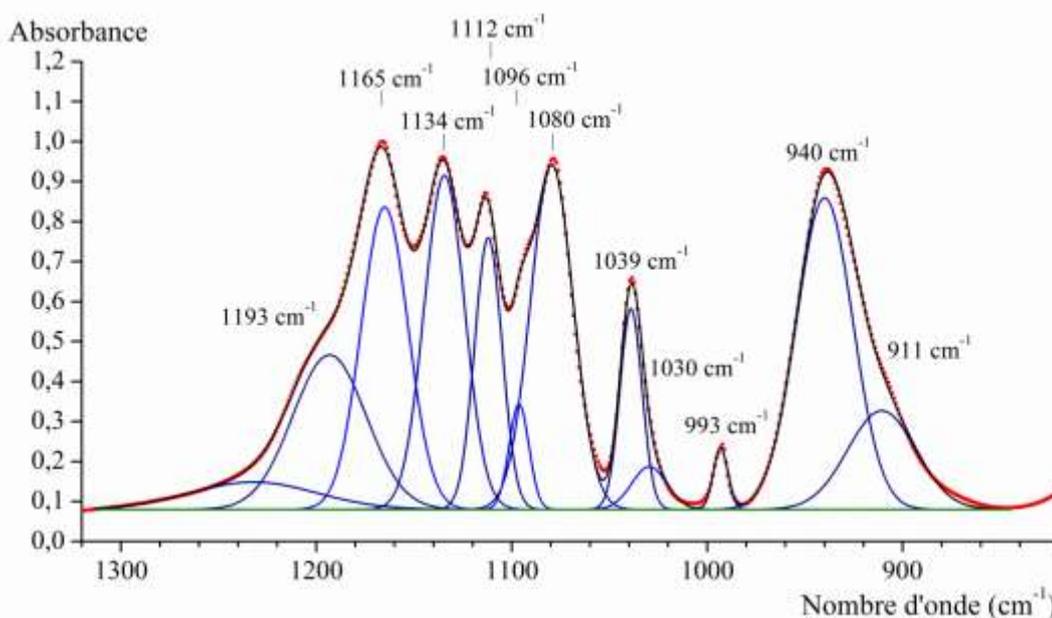


Figure III-30 : Spectre FTIR de la phase m-CPPD et sa décomposition en profils gaussiens. Les points rouges représentent le spectre expérimental, les courbes bleues les profils associés aux vibrations à une fréquence donnée, la courbe noire la somme des contributions et en vert le fond continu.

Ainsi le cas particulier de la vibration $\nu^{\text{as}}_{\text{PO}_4}$ identifiée par Cornilsen en comparant les spectres obtenus par spectroscopies Raman et FTIR est très intéressant, et ce pour toutes les phases étudiées. La fréquence de cette vibration, située à 1034 cm^{-1} par Cornilsen pour t-CPPD, s'intercalerait entre les fréquences d'élongation antisymétrique, à 990 et 1084 cm^{-1} . Cette bande, d'après notre modèle *ab initio*, pourrait cependant correspondre à une bande d'élongation antisymétrique de la liaison P-O-P particulièrement haute en énergie, simulée à 962 cm^{-1} ou une bande de vibration $\nu^{\text{s}}_{\text{PO}_4}$ avec les deux groupements PO_4 en opposition de phase. La vibration correspondante est représentée dans la figure III-30 dans le cas de la structure m-CPPD. La bande à 990 cm^{-1} serait donc attribuée à une liaison P-O asymétrique sur la base de son énergie élevée et de son intensité relativement faible, et en considérant l'existence d'une bande à plus basse fréquence $\nu^{\text{as}}_{\text{POP}}$. Mais nos simulations montrent qu'elle pourrait également correspondre à une bande de la liaison P-O-P. Remarquons qu'en utilisant cette terminologie, cette vibration équivaut deux vibrations $\nu^{\text{s}}_{\text{PO}_4}$ des deux groupements PO_4 en opposition de phase. La vibration ν_{PO_4} serait alors symétrique et non antisymétrique. Ainsi, par cette nouvelle attribution, l'ordre de fréquence entre bande antisymétrique et symétrique est conservé ; l'attribution est donc compatible avec les comparaisons faites entre spectres Raman et infrarouge et en accord avec l'ordre des groupements mis en jeu par les élongations de la liaison P-O-P qui seraient moins énergétiques que celles des liaisons P-O.

(3) Spectroscopie Raman

De même, des modélisations des spectres Raman ont été effectuées en calculant la dérivée

spatiale de la polarisation. Les résultats sont là encore suffisamment proches des mesures expérimentales pour effectuer l'attribution des fréquences de vibration (figure III-31). La modélisation des spectres vibrationnels est très sensible aux données initiales, avec de forts problèmes de divergence lors des calculs des spectres Raman notamment. Les intensités Raman sont en effet issues d'une dérivée troisième de l'énergie, le modèle initial et les critères de convergence doivent être soigneusement choisis. Cette approche valide ainsi une nouvelle fois les structures *ab initio* utilisées pour modéliser les phases de CPP. Les positions et l'attribution des bandes du spectre Raman des phases hydratées de CPP étudiées sont reportées dans le tableau III-31.

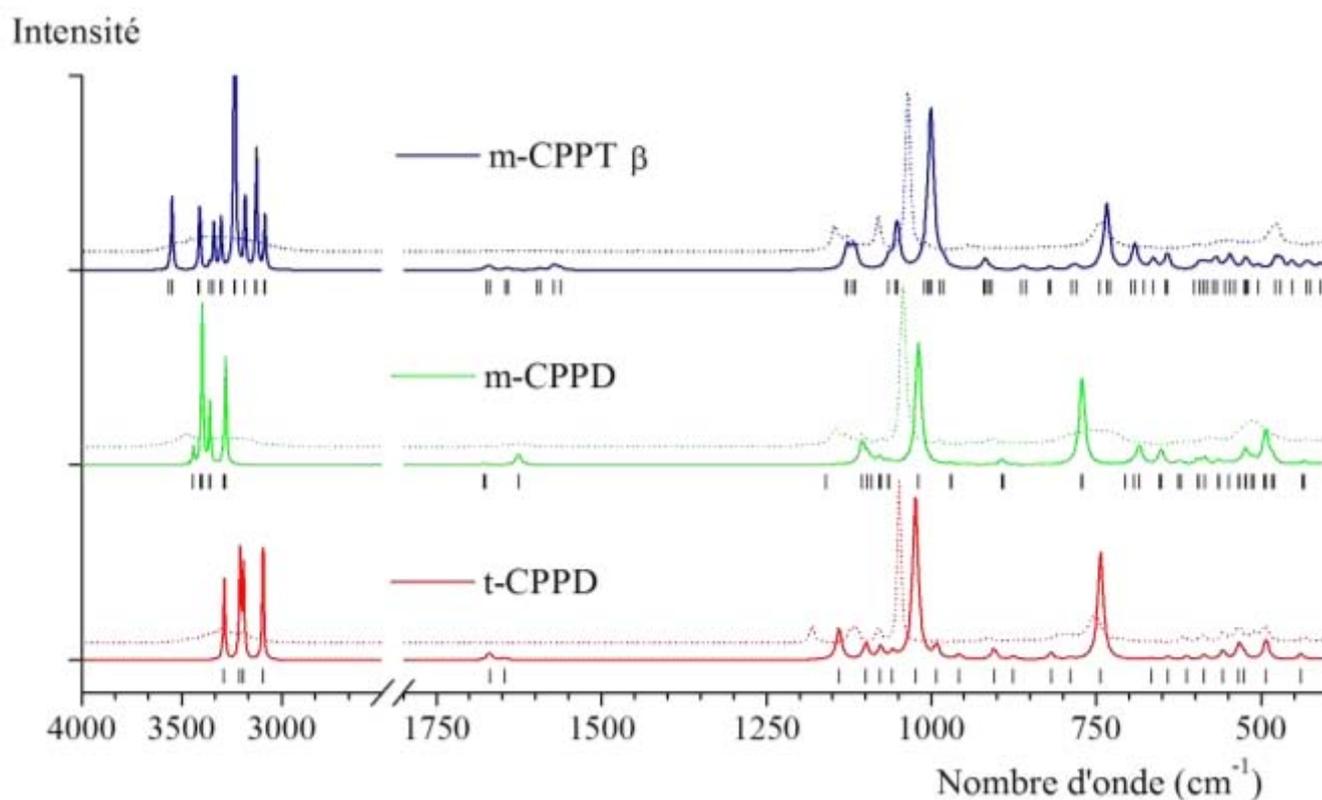


Figure III-31 : Spectres Raman simulés (continus) et expérimentaux (tirets) des phases de CPP. Les repères noirs représentent les fréquences des bandes associées.

Tableau III-31 : Position des bandes de vibration (cm^{-1}) et leur attribution pour les composés m-CPPD, t-CPPD et m-CPPT β d'après les modélisations DFPT de spectre Raman.

t-CPPD		m-CPPT β		m-CPPD		Assignement.
Fréquence (cm^{-1})	Intensité (u.a.)	Fréquence (cm^{-1})	Intensité (u.a.)	Fréquence (cm^{-1})	Intensité (u.a.)	
743	105	734	113	771	1	$\nu_{\text{POP}}^{\text{s}}$
789	2			771	198	
818	8	819	6			H ₂ O Lib.
875	4					$\nu_{\text{POP}}^{\text{as}}$
904	14	862	7			H ₂ O Lib.
957	6	918	20	891	1	$\nu_{\text{POP}}^{\text{as}}/\nu_{\text{PO}_4}^{\text{s}}$
		920	6	893	13	
		982	15	969	2	
		987	2	970	2	
992	18	1000	378	1019	1	$\nu_{\text{PO}_4}^{\text{s}}$
		1002	6	1019	399	
		1005	56			
		1010	3			
1024	235	1052	126	1063	7	$\nu_{\text{PO}_4}^{\text{as}}$
1058	10	1055	2	1065	3	
1077	19	1064	13	1076	8	
1099	24	1065	17	1079	16	
1140	52	1115	46	1090	10	
		1119	29	1097	28	
		1127	48	1105	79	
		1129	23	1160	1	
1647	6	1562	12	1626	64	δ_{HOH}
1669	20	1572	27	1626	1	
		1593	7	1676	1	
		1641	10	1677	6	
		1645	3			
		1669	16			
		1674	13			
3095	819	3084	239	3281	1919	ν_{OH}
3191	701	3086	498	3291	194	
3209	832	3128	1544	3358	69	
3288	659	3131	133	3359	1122	
		3183	550	3398	3148	
		3184	456	3406	60	
		3233	187	3441	67	
		3236	5256			
		3304	761			
		3339	708			
		3361	94			
		3411	990			
		3415	33			
		3548	1257			
		3561	65			

Les écarts encore observés pourraient être réduits par l'utilisation de critères de convergence plus fins, ainsi que de modèles améliorés des structures cristallines issus des derniers résultats des affinements Rietveld. Des modélisations de spectres ont été initiés pour estimer l'apport de ces modèles plus complets mais plus consommateurs de ressources numériques, les résultats ne sont cependant pas encore disponibles.

B2. Spectroscopies par résonance magnétique nucléaire du solide ^{31}P et ^{43}Ca

La résolution de structure cristallographique utilisant la spectroscopie par résonance magnétique est un outil de plus en plus développé, combinant résolution de structure par analyse des diagrammes de diffraction, analyse des spectres RMN et modélisation *ab initio*. L'approche multi-échelle de cette méthode permet de combler différentes lacunes inhérentes à ces méthodes et de fournir ainsi une description précise de la structure. Dans notre cas, la spectroscopie RMN pourrait de plus être utilisée dans la caractérisation de molécules absorbées à la surface des cristaux de CPP. Une analyse multi-élémentaire a donc été réalisée afin de servir de référence dans de futures études autant que pour vérifier les modèles structuraux utilisés.

Les analyses de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du solide ont été réalisées en collaboration avec Christian Bonhomme et Christel Gervais du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris ainsi que Danielle Laurencin de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier.

(1) Spectres RMN-MAS ^{31}P et ^{43}Ca

Les spectres RMN-MAS ^{31}P révèlent des déplacements négatifs par rapport à la référence, une solution à 85% de H_3PO_4 , qui sont caractéristiques des molécules de pyrophosphate (figure III-32 a). Les signaux attestent de plus de la présence de deux environnements distincts pour les atomes de phosphore, en accord avec les symétries des mailles cristallines, avec des déplacements caractéristiques pour chacune des phases. Ces déplacements sont récapitulés dans le tableau III-32. La bande de déplacement chimique de la phase amorphe englobe les différentes fréquences des phases cristallisées.

Les spectres RMN-MAS ^{43}Ca (figure III-32b) sont eux aussi compatibles avec les symétries des structures analysées, bien que seule la phase m-CPPD possède un spectre présentant deux fréquences distinctes. Les spectres ont ainsi été affinés afin de rendre compte de ces deux environnements. Les résultats sont récapitulés dans le tableau III-32

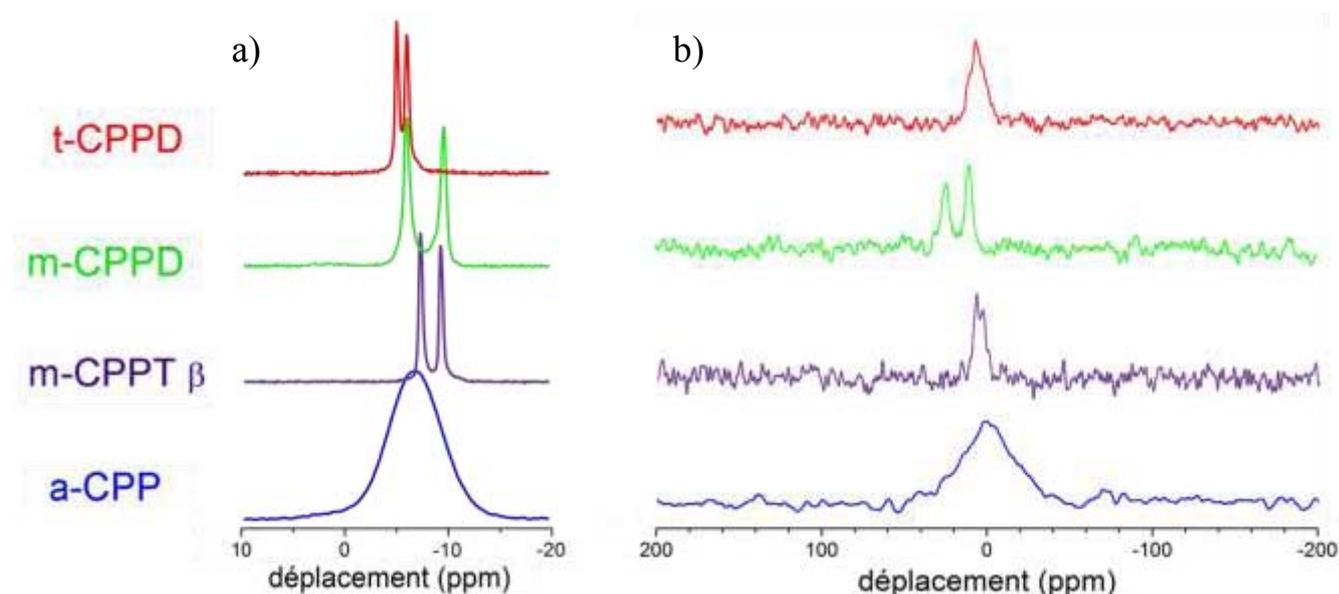

 Figure III-32 : Spectres RMN-MAS ^{31}P (a) et ^{43}Ca (b) des phases de CPP synthétisées.

 Tableau III-32 : Déplacements chimiques (ppm) expérimentaux des composés m-CPPD, t-CPPD et m-CPPT β en RMN-MAS ^{31}P et ^{43}Ca .

	δ_{iso} (ppm)			
	P_1	P_2	Ca_1	Ca_2
t-CPPD	-5,9	-5,0	14,5	12,0
m-CPPD	-5,9	-9,8	29,0	14,0
m-CPPT β	-9,3	-7,3	11,0	7,1

Des tentatives d'attribution des différentes fréquences observées en fonction de critères géométriques ont été réalisées, notamment en utilisant les distances moyennes aux atomes d'oxygène, les distances maximales, le volume du polyèdre associé à l'atome observé et la distorsion de ce polyèdre. Aucune relation directe n'a cependant pu être établie.

(2) Modélisation des spectres RMN

Les spectres ont été calculés en utilisant une fonctionnelle d'échange non-locale GBA-PBE et les électrons de valence ont été modélisés par un pseudo-potentiel à norme conservative [Gervais *et al.*, 2008]. Les données préliminaires de ces simulations sont compilées dans le tableau III-33.

Tableau III-33 : Déplacements chimiques (ppm) simulés des composés m-CPPD, t-CPPD et m-CPPT β en RMN-MAS ^{31}P et ^{43}Ca .

	δ_{iso} (ppm)			
	P_1	P_2	Ca_1	Ca_2
t-CPPD	-7,8	-4,5	13,8	12,0
m-CPPD	1,8	-4,5	24,6	10,4
m-CPPT β	-15,8	-6,9	11,9	11,4

Les écarts plus importants sont observés pour les structures m-CPPD et m-CPPT β par rapport aux valeurs expérimentales, révélant les imprécisions des structures considérées. Les effets particulièrement prononcés des positions des atomes d'hydrogène sur le déplacement chimique ont pu notamment être mis en évidence au travers de différents essais de structure. De nouvelles tentatives de modélisation sont en cours à partir des dernières structures obtenues par analyse des diagrammes de diffraction, le but étant de faire correspondre un ordre local, observé par RMN, à l'ordre cristallin pour obtenir une structure la plus vraisemblable possible.

C. Analyses morphologiques des phases de CPP

De nombreuses propriétés des pyrophosphates de calcium hydratés, et dans une large gamme de minéralisations biologiques en général, ont été reliées à la chimie de surface des composés [Lieske *et al.*, 1996a; b, 1997]. Dans le cas des CPP, les propriétés inflammatoires sont ainsi dépendantes de la nature de la phase et de la morphologie des cristaux [Roch-Arveiller *et al.*, 1990; Swan *et al.*, 1995]. Cette partie s'attachera à la compréhension des propriétés morphologiques et de surface des CPP à travers leurs déterminations physico-chimiques.

C1. Données bibliographiques

(1) Morphologies et potentiel inflammatoire

Le lien entre morphologie et propriété inflammatoire pour les phases de CPP a été établi de différentes manières, lors d'études *in vivo* et à partir de prélèvements sur patients arthritiques [Roch-Arveiller *et al.*, 1990; Swan *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2009]. Le potentiel inflammatoire des phases de CPP a été estimé *in vivo* par l'injection de cristaux en suspension dans une cavité pleurale chez le rat ou par mise en contact avec des chondrocytes et des synoviocytes. Ainsi ce potentiel dépend de la phase cristalline considérée ; m-CPPD étant plus inflammatoire que t-CPPD, lui-même plus inflammatoire que m-CPPT β [Roch-Arveiller *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2009]. De même, le faciès et la taille des cristaux influencent les propriétés phlogogènes du système. Les profils aciculaires de cristaux de m-CPPD et t-CPPD se montrent plus susceptibles de déclencher une réponse inflammatoire élevée que le faciès plaquettaire de m-CPPT β . On observe cependant une nette augmentation des marqueurs de l'inflammation lorsque la taille des cristaux de m-CPPT β diminue en dessous du micromètre [Roch-Arveiller *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2009]. L'influence de la taille a aussi été mise en évidence sur le taux de cristaux phagocytés, une petite taille favorisant la phagocytose [Schumacher *et al.*, 1975]. De plus, des prélèvements de liquide synovial sur patients arthritiques lors de crise de pseudogoutte révèlent que la taille des cristaux tout comme le ratio m-CPPD/t-CPPD sont plus élevés lors d'une crise aiguë que lors d'une crise modérée [Swan *et al.*, 1995].

Il est ainsi établi que les cristaux de pyrophosphate de calcium provoquent une réaction inflammatoire, dépendante de leur taille, leur faciès et leur phase cristalline. Notons qu'en raison de la grande diversité des facteurs influençant le potentiel inflammatoire, il est nécessaire de caractériser le plus finement possible les cristaux en termes de phase cristalline, de taille et de faciès. Si la question sur l'origine de leur formation reste posée, et sera commentée dans le chapitre IV, les cristaux de CPP apparaissent comme un élément aggravant des crises inflammatoires et des arthropathies destructives.

(2) Mécanisme de rupture membranaire.

Ces différences de potentiel inflammatoire en fonction du faciès et de la phase cristalline révèlent des mécanismes pouvant faire intervenir la chimie de surface de ces cristaux. Un mécanisme de rupture cellulaire, proposé par Mandel et développé par Wierzbicki, repose sur l'interaction entre la membrane cellulaire, composée de phospholipides, et la surface chargée du cristal [Mandel, 1976; Wierzbicki *et al.*, 2003]. La similitude entre la tête polaire des molécules de phospholipides, comprenant un groupe phosphate, et les molécules présentes à la surface du cristal pourrait favoriser une adsorption de la membrane cellulaire sur les cristaux et donc son immobilisation, provoquant sa rupture et par conséquent la mort cellulaire. Ce modèle, développé sur la base de calcul *ab initio*, n'a cependant pas été observé directement dans le cas des cristaux de CPP mais il est cependant appuyé par des preuves indirectes dans le cas d'autres minéralisations pathologiques. Il a été ainsi démontré que l'adhésion cellulaire à la surface de cristaux d'oxalate de calcium monohydraté implique des sites anioniques à la surface de cellule rénale épithéliale [Lieske *et al.*, 1996b, 1997]. De même, les cristaux pouvant provoquer une inflammation aigüe, tels que l'urate de monosodium, le dioxyde de silicium sous la forme α -quartz ou les CPPD, possèdent une surface fortement chargée, lorsque d'autres phases apparaissent « inertes » comme la brushite ou l'hydroxyapatite mais aussi le diamant ou le dioxyde de silicium sous la forme anatase [Terkeltaub, 1997].

Ce mécanisme, dans le cas des pyrophosphates de calcium hydratés, peut être utilisé pour comparer les différents potentiels inflammatoires observés en fonction des chimies de surface des différents cristaux suivant leur phase cristalline.

(3) Morphologie des cristaux de CPP

Plusieurs faciès ont été décrits pour les cristaux de pyrophosphate de calcium suivant le type de phase mais aussi pour une même phase. Les cristaux des phases m-CPPD et t-CPPD sont ainsi décrits comme aciculaires et les cristaux de m-CPPT β comme plaquettaires et hexagonaux, allongés suivant l'une des directions de l'hexagone [Brown *et al.*, 1963; Mandel *et al.*, 1988; Christoffersen & Christoffersen, 2003]. Des variations dans le faciès de la phase t-CPPD ont de plus été observées, avec des faciès décrits comme colonnaires ou aciculaires possédant des différences dans les portions entre les tailles et dans l'angle formé par la surface la moins développée avec l'axe long du cristal [Cheng & Pritzker, 1981; Mandel *et al.*, 1988; Christoffersen *et al.*, 1999, 2001].

Ces faciès ont été reliés, dans le cas des phases t-CPPD et m-CPPT β , à des morphologies particulières issues des déterminations des structures sur monocristaux [Mandel, 1975; Balić-Žunić *et al.*, 2000]. Les cristaux de la phase m-CPPT β ont fait l'objet d'une description complète donnée par

Balić-Žunić *et al.* Ces cristaux seraient plaquettaires dont la forme correspondrait aux plans {100}, {001} et {011} dans des proportions $0,243 \times 0,055 \times 0,009 \mu\text{m}^3$. Les cristaux de la phase t-CPPD sont ainsi eux décrits comme étant allongés suivant l'axe \vec{c} sans précision sur leur morphologie globale. Celle-ci a cependant été détaillée par Wierzbicki & Cheung sur la base d'une modélisation *ab initio* et comparée aux deux faciès observés [Wierzbicki & Cheung, 1998]. Les cristaux posséderaient donc deux morphologies différentes associées aux plans {100}, {001} et {01-1} et {100}, {001} et {001}. Ces morphologies n'ont pas, à notre connaissance, été prouvées expérimentalement autrement que par comparaison avec les faciès expérimentaux, sans apport de la diffraction. La morphologie des cristaux de la phase m-CPPD n'a pas été décrite, probablement par manque de structure publiée.

C2. Morphologies des cristaux de CPP

Le but de cette partie est d'établir la morphologie des cristaux des différentes phases de pyrophosphate calcium hydraté. Ces déterminations seront basées sur des observations du faciès des cristaux, des modélisations *ab initio* et des vérifications des orientations par diffraction électronique.

(1) *Faciès des cristaux de CPP*

Plusieurs faciès des cristaux de CPP ont été observés suivant les différents protocoles de synthèse utilisés (chapitre II). Ceux-ci correspondent à ceux décrits dans la littérature et précisent le faciès des cristaux de la phase m-CPPD : des cristaux aciculaires pour les phases t-CPPD et m-CPPD et plaquettaires pour la phase m-CPPT β . Les cristaux de la phase m-CPPD possèdent un profil généralement mal défini, et peuvent dans certaines conditions de synthèse présenter un faciès hexagonal sur la face la plus étroite.

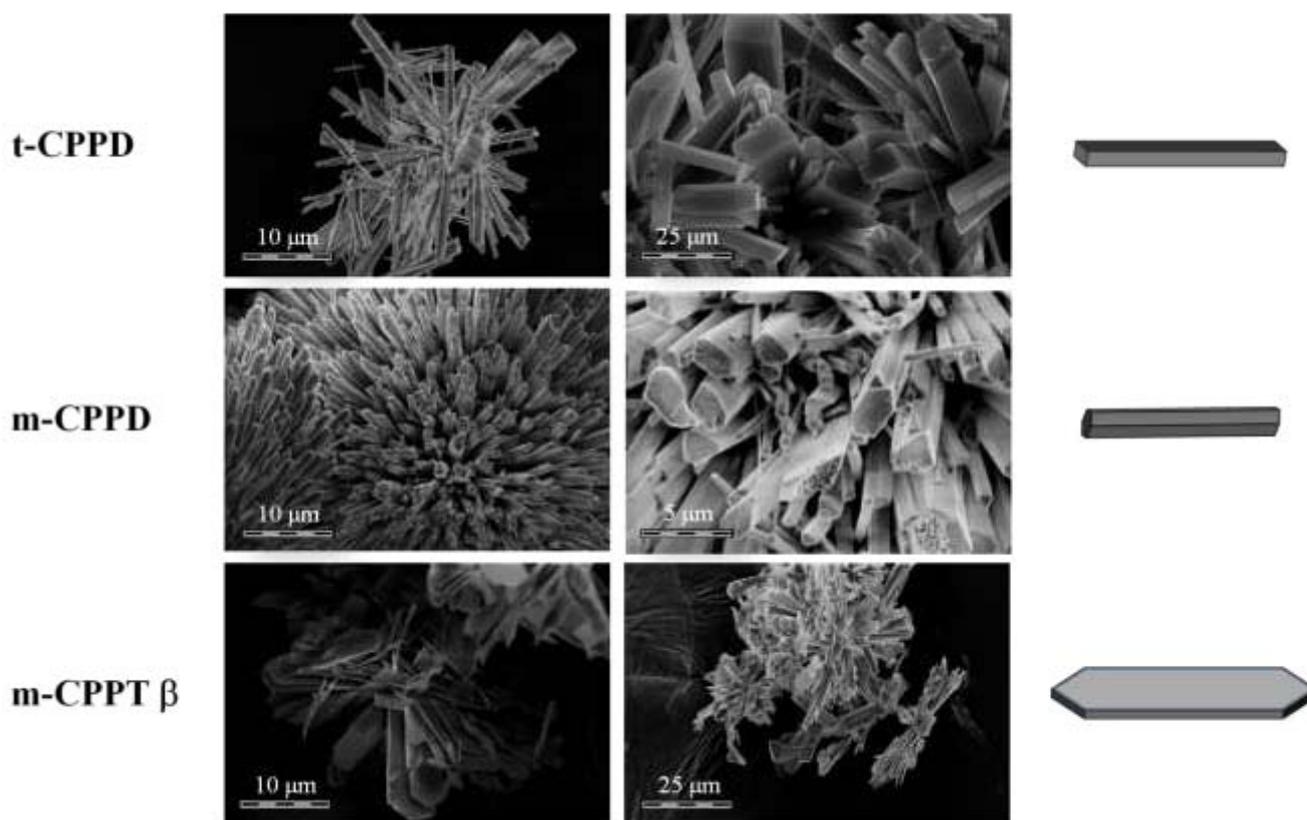


Figure III-33 : Faciès généraux des cristaux de CPP.

Ces faciès, en se basant sur les analyses d'orientation préférentielle et des fonctions anisotropes, correspondent à des orientations suivant l'axe c de la maille cristalline pour les phases m-CPPD et –CPPD et à un plan basal (100) pour la phase m-CPPT β . Ces résultats sont conformes aux données de la littérature pour les deux phases décrites.

(2) *Simulations ab initio*

En raison de la faible qualité des cristaux, de leurs évolutions à basse pression et à haute température et de la basse symétrie des structures cristallines, une identification directe des différentes faces du cristal par diffraction des rayons X ou électronique s'est avérée difficile. Un premier tri a été effectué parmi toutes les faces possibles en utilisant des simulations *ab initio*.

Détermination de la morphologie par la théorie Bravais-Fridel-Donnay-Harker (BFDH)

La morphologie des cristaux est liée à l'énergie de chacune des faces, celle-ci étant définie comme la quantité d'énergie nécessaire pour augmenter l'aire de la surface étudiée de 1 m^2 . Plus l'énergie d'une surface est élevée, plus les conditions d'augmentation de l'aire sont exigeantes.

En considérant une maille de volume V , l'aire de la face (hkl) A_{hkl} pour une maille cristalline est donnée par la relation (III-1) :

$$V = A_{hkl} d_{hkl} \quad (\text{III-1})$$

avec d_{hkl} , la distance inter-réticulaire. Cette relation est déduite directement de la définition de la distance interréticulaire. En considérant l'énergie totale de la maille, une augmentation de l'aire conduit à une diminution de la distance interréticulaire.

Ainsi, les faces les plus développées auront la distance inter-réticulaire la plus faible en ne prenant en compte que des considérations purement géométriques. Cette relation a été complétée par Donnay et Harker en tenant compte des symétries du cristal étudié. Les règles d'extinction s'appliquent alors au calcul des aires des faces du cristal, une « face » devant contenir tous les nœuds du réseau.

La théorie BFDH ne prend cependant pas en compte les atomes constituant le cristal et donc les différentes liaisons pouvant affecter la morphologie générale. Elle n'évalue pas non plus l'effet des conditions de synthèse (utilisation d'un solvant, sursaturation, ...) sur la morphologie du cristal.

On représentera dans les modélisations en trois dimensions la distance entre le centre du cristal et le centre de la face hkl , R_{hkl} , inversement proportionnelle à l'énergie de la face considérée. Les aires relatives pour les trois phases de CPP étudiées sont reportées dans le tableau III-34.

Les morphologies simulées par la méthode BFDH reprennent les orientations obtenues par diffraction des rayons X (figure III-34). De plus, le faciès hexagonal des cristaux de la phase m-CPPD peut être expliqué par une croissance majoritaire des faces $\{200\}$ et $\{110\}$ donnant à l'extrémité $\{10\bar{1}\}$ sa forme particulière. L'orientation des cristaux de la phase m-CPPD suivant l'axe \vec{c} justifie ici l'utilisation du groupe d'espace $P2_1/n$ au lieu de $P2_1/c$, où l'orientation des cristaux correspondrait à $a+c$, afin de simplifier la description. La grande simplicité du modèle ne permet cependant pas de simuler la morphologie exacte des cristaux ; les aires relatives et l'existence de plusieurs autres faces ne concordant pas avec les observations.

Tableau III-34 : Aire relative des plans des familles {hkl} pour les phases de CPP hydraté étudiées.

m-CPPT β				
hkl	Multiplicité	d_{hkl} (Å)	R_{hkl}	% Aire Totale
{1 0 0}	2	11,40	8,77	42,4
{0 1 1}	4	6,11	16,37	19,2
{1 1 $\bar{1}$ }	4	6,01	16,65	13,9
{1 1 0}	4	6,39	15,64	11,9
{1 0 $\bar{2}$ }	2	5,40	18,52	11,1
{0 0 2}	2	4,99	20,04	1,3

t-CPPD				
hkl	Multiplicité	d_{hkl} (Å)	R_{hkl}	% Aire Totale
{0 1 0}	2	7,94	12,59	33,5
{1 0 0}	2	7,04	14,20	27,5
{0 0 1}	2	6,26	15,98	17,6
{1 0 1}	2	5,54	18,04	9,4
{0 1 $\bar{1}$ }	2	5,51	18,15	7,1
{1 $\bar{1}$ 1}	2	5,04	19,83	4,3
{1 $\bar{1}$ 0}	2	5,32	18,81	0,6

m-CPPD				
hkl	Multiplicité	d_{hkl} (Å)	R_{hkl}	% Aire Totale
{1 1 0}	4	7,39	13,53	50,5
{1 0 $\bar{1}$ }	2	6,60	15,14	21,8
{2 0 0}	2	6,13	16,30	10,2
{0 1 1}	4	5,38	18,58	8,0
{1 0 1}	2	5,27	18,99	6,6
{1 1 $\bar{1}$ }	4	5,38	18,60	3,1

Bien que cette théorie utilise des approximations très fortes sur la morphologie du cristal, elle permet de cibler les faces qui possèdent les plus grandes probabilités de développement à partir des paramètres de maille et du groupe de symétrie. La prochaine étape consiste à prendre en compte l'organisation structurale de la phase afin de mieux décrire l'énergie d'une surface donnée.

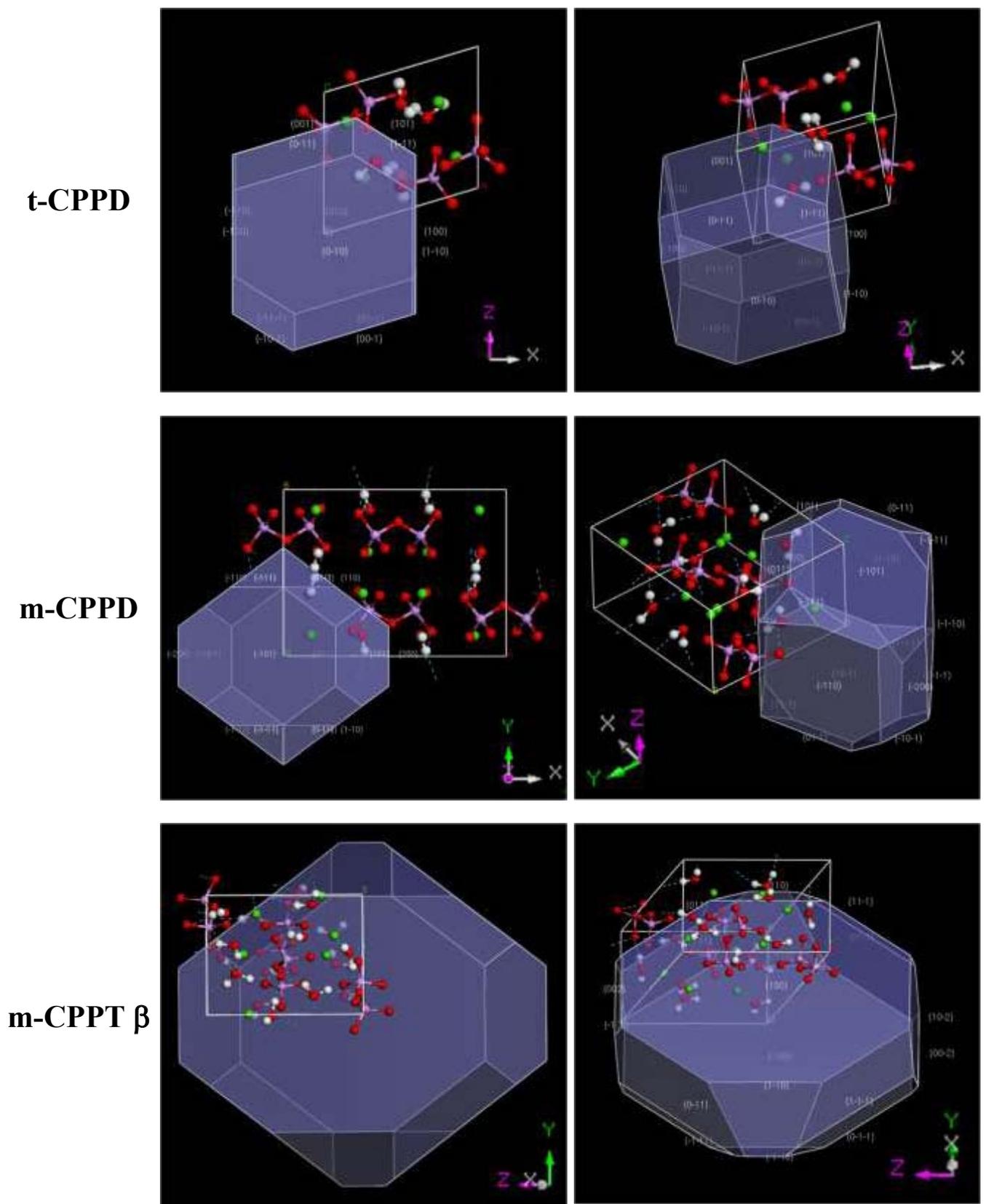


Figure III-34 : Modélisation des morphologies des différents cristaux de CPP hydraté par la méthode BFDH.

Morphologie à l'équilibre

La méthode d'évaluation de la morphologie à l'équilibre repose sur l'évaluation de l'énergie d'une tranche définie de la structure, formant une couche en deux dimensions, à 0 K. L'énergie de surface est calculée comme une moyenne de l'énergie de cette couche, entre les surfaces possédant les indices de Miller $\{hkl\}$ et $\{\bar{h}\bar{k}\bar{l}\}$.

$$R_{hkl} = \frac{1}{2} \lim_{M \rightarrow \infty} \frac{|E_{maille}(M) - E_{couche}(M)|}{A_{hkl}} \quad (\text{III-2})$$

La figure de Wulff est alors utilisée pour représenter la morphologie théorique du cristal [Wulff, 1901].

Dans notre cas, les calculs ont été réalisés sur les 8 premières familles de plans fournies par la méthode BFDH, chacune des configurations possibles d'un plan ayant été analysée. La couche considérée possède une épaisseur d_{hkl} si $d_{hkl} > 5 \text{ \AA}$ et $2d_{hkl}$ si $d_{hkl} < 5 \text{ \AA}$, afin d'optimiser le temps de calcul à disposition. Cette couche est mise en contact avec une couche intermédiaire vide de 12 \AA d'épaisseur. La densité électronique est inférieure à $10^{-6} \text{ e} \cdot \text{\AA}^{-3}$ au centre de la couche intermédiaire. La modélisation *ab initio* a été réalisée via le logiciel Materials Studio version 7.0 utilisant le module DMol3 et la fonctionnelle d'échange non-locale GBA-PBE associée à la correction de dispersion (DFT-D) de Grimme et à la base DNP 4 .4 (Double Numerical plus Polarization) [Perdew *et al.*, 1996; Grimme, 2006]. L'échantillonnage de la zone de Brillouin considérée correspond à une grille de Monkhorst et Pack $1 \times 1 \times 1$ [Monkhorst & Pack, 1976].

La distance entre le centre du cristal et le centre de la face hkl , R_{hkl} , est donnée dans les tableaux III-35. La modélisation des morphologies à l'équilibre des cristaux de CPP est présentée figure III-35.

Tableau III-35 : Aires relatives des plans des familles {hkl} pour les phases de CPP hydraté étudiées.

m-CPPT β					
hkl	Multiplicité	d_{hkl} (Å)	ΔE (mHa)	R_{hkl}	% Aire Totale
{1 0 0}	2	11,40	42,9	5,14*	47,8
{0 1 1}	4	6,11	154,3	9,90*	37,1
{1 1 $\bar{1}$ }	4	6,01	182,2	11,49	6,4
{1 1 0}	4	6,39	176,2	11,83	1,4
{1 0 $\bar{2}$ }	2	5,40	239,9	13,60	6,4
{0 0 2}	2	4,99	133,7	14,01	0,9

t-CPPD					
hkl	Multiplicité	d_{hkl} (Å)	ΔE (mHa)	R_{hkl}	% Aire Totale
{0 1 0}	2	7,94	49,3	10,48*	30,4
{1 0 0}	2	7,04	61,4	11,38	22,0
{0 0 1}	2	6,26	85,2	14,01*	16,2
{1 0 1}	2	5,54	91,6	13,31	15,2
{0 1 $\bar{1}$ }	2	5,51	121,1	17,63	2,9
{1 $\bar{1}$ 1}	2	5,04	123,5	16,59	2,4
{1 $\bar{1}$ 0}	2	5,32	85,0	11,99	10,9

m-CPPD					
hkl	Multiplicité	d_{hkl} (Å)	ΔE (mHa)	R_{hkl}	% Aire Totale
{1 1 0}	4	7,39	94,1	9,05*	44,2
{1 0 $\bar{1}$ }	2	6,60	218,6	19,00	
{2 0 0}	2	6,13	58,9	9,38	18,8
{1 0 1}	2	5,27	201,2	13,40	
{1 1 $\bar{1}$ }	4	5,38	167,5	11,81	22,1
{0 0 2}	2	3,31	137,6	11,65	14,9

La prise en considération des atomes et des liaisons interatomiques modifie la morphologie par rapport à celle de la méthode BFDH (figures III-38 et III-39). Les faces principales, ayant les plus grandes aires, sont identiques pour les phases t-CPPD et m-CPPT β . De même, les faces latérales de m-CPPD développées le long de l'axe \vec{c} , {1 1 0} et {2 0 0}, sont identiques. Seul change l'ordre des faces minoritaires ce qui renforce les premiers résultats obtenus par des considérations énergétiques fortement simplifiées.

Les conditions d'application ne sont cependant pas optimales. Elles ne prennent en compte qu'une seule épaisseur d_{hkl} , effectuant les calculs de minimisation de l'énergie de la couche en contact avec le vide et non un potentiel ou un solvant. Une épaisseur de couche trop faible, ce qui est le cas ici pour les faces ayant les distances inter-réticulaires les plus faibles, implique que les potentiels d'une

face interagissent avec l'autre face rendant le calcul de l'énergie de surface incorrect. Les faces ayant les plus basses distances inter-réculaires possèdent potentiellement par cette méthode une énergie surfacique surestimée conduisant à une aire sous-estimée.

Ces analyses révèlent cependant l'existence potentielle des faces $\{1\ 0\ \bar{2}\}$ pour les cristaux de la phase m-CPPT β , au lieu des $\{0\ 0\ 1\}$ décrites par Balić-Žunić *et al.* [Balić-Žunić *et al.*, 2000] et sont cohérentes avec la description de Wierzbicki & Cheung pour la phase t-CPPD avec des orientations $\{100\}$, $\{001\}$ et $\{01\bar{1}\}$ et $\{100\}$, $\{001\}$ et $\{001\}$ [Wierzbicki & Cheung, 1998]. La phase m-CPPD présenterait sur son grand axe les faces $\{100\}$ et $\{110\}$.

Afin d'augmenter la vraisemblance du modèle, la permittivité relative de l'eau (78,54) a été introduite en utilisant le modèle COSMO (CONductor-like Screening MOdel) dans le cas de la face $\{100\}$ [Delley, 2006]. Chaque molécule ou atome forme dans ce modèle une cavité dans un continuum diélectrique possédant une certaine permittivité. La face $\{100\}$ de la phase m-CPPT β a été choisie comme modèle pour cette modélisation à cause de la présence de molécule d'eau en surface pouvant être stabilisée par la présence du potentiel. La simulation indique que la différence d'énergie avec la maille cristalline diminue, passant de $\Delta E = 42,9$ mHa à 24,0 mHa. Cette diminution significative implique une augmentation de l'aire de cette face. Dans ce cas, le modèle tend donc vers la morphologie plaquettaire observée expérimentalement lorsqu'on augmente sa précision.

Les calculs n'ayant pas convergé dans le temps imparti pour l'ensemble des faces de la structure m-CPPT β , la morphologie totale n'a cependant pas pu être établie. Au delà du potentiel constant, une modélisation dynamique du solvant pourrait encore augmenter la précision du modèle.

Les résultats concernant les différentes faces simulées, notamment les faces présentant les plus grandes aires, nous permettent de cibler les faces cristallines les plus probables apparaissant dans la morphologie des cristaux. Ces premiers tris sont donc utilisés pour analyser les données expérimentales.

(3) *Microscopie électronique en transmission et diffraction électronique*

La morphologie expérimentale des cristaux de pyrophosphate de calcium hydraté synthétisés a été déterminée par l'utilisation combinée de la diffraction électronique et de la microscopie électronique en transmission. Le faciès observé par microscopie a été relié à l'orientation cristalline déterminée par diffraction électronique.

Les différentes images ont été obtenues avec un microscope JEOL Jsm 2100F haute résolution. Les images ont été analysées avec le logiciel *CrystalMaker 2.1.5*. La qualité des échantillons et leur résistance sous le faisceau ne nous ont cependant pas permis d'atteindre la résolution maximale. Les échantillons possèdent ainsi potentiellement une structure modifiée (paramètres de maille, composition, placements atomiques) par rapport à celle déterminée précédemment par effet du vide et de l'énergie du faisceau utilisés en microscopie électronique. Une estimation de ces modifications, prise en compte ici, a été réalisée et est présentée dans le chapitre IV.

La morphologie des cristaux de t-CPPD, m-CCPT β et m-CPPD ainsi que le cliché de diffraction électronique sont présentés respectivement sur les figures III-36, III-37, III-38 et III-39.

Morphologie des cristaux de la phase t-CPPD

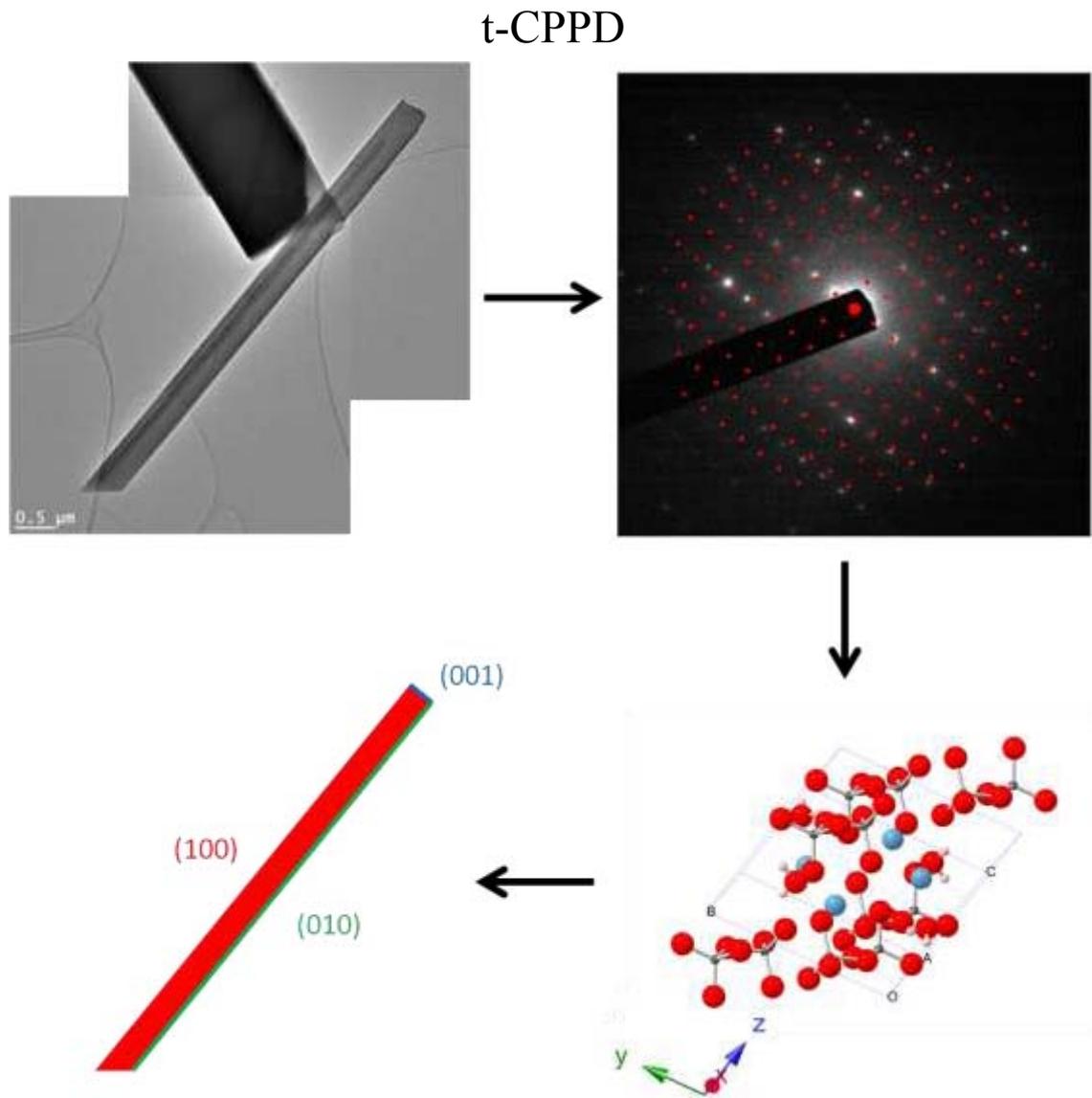


Figure III-36 : Morphologie d'un cristal de la phase t-CPPD analysé par MET et diffraction électronique.

Une image réalisée par microscopie électronique à transmission est associée à un cliché de diffraction électronique issu de ce même cristal. Les réflexions simulées à partir de la structure de la phase (points rouges) sont ensuite reliées au cliché de diffraction afin de connaître l'orientation de la maille cristalline dans le cristal observé. Finalement la morphologie du cristal est obtenue par comparaison avec l'orientation de la maille.

Les cristaux de la phase t-CPPD observés possèdent une orientation globale suivant l'axe \vec{c} avec des faces $\{100\}$ et $\{010\}$ formant la majorité de la surface cristalline. Des clichés de diffraction électronique avec les axes \vec{a}^* ou \vec{b}^* formant l'axe de zone ont été observés. Les orientations des faces les moins développées semblent moins bien définies, rendant difficile leur détermination. Cette morphologie est cohérente avec les simulations et confirme expérimentalement le modèle.

Morphologie des cristaux de la phase m-CPPT β

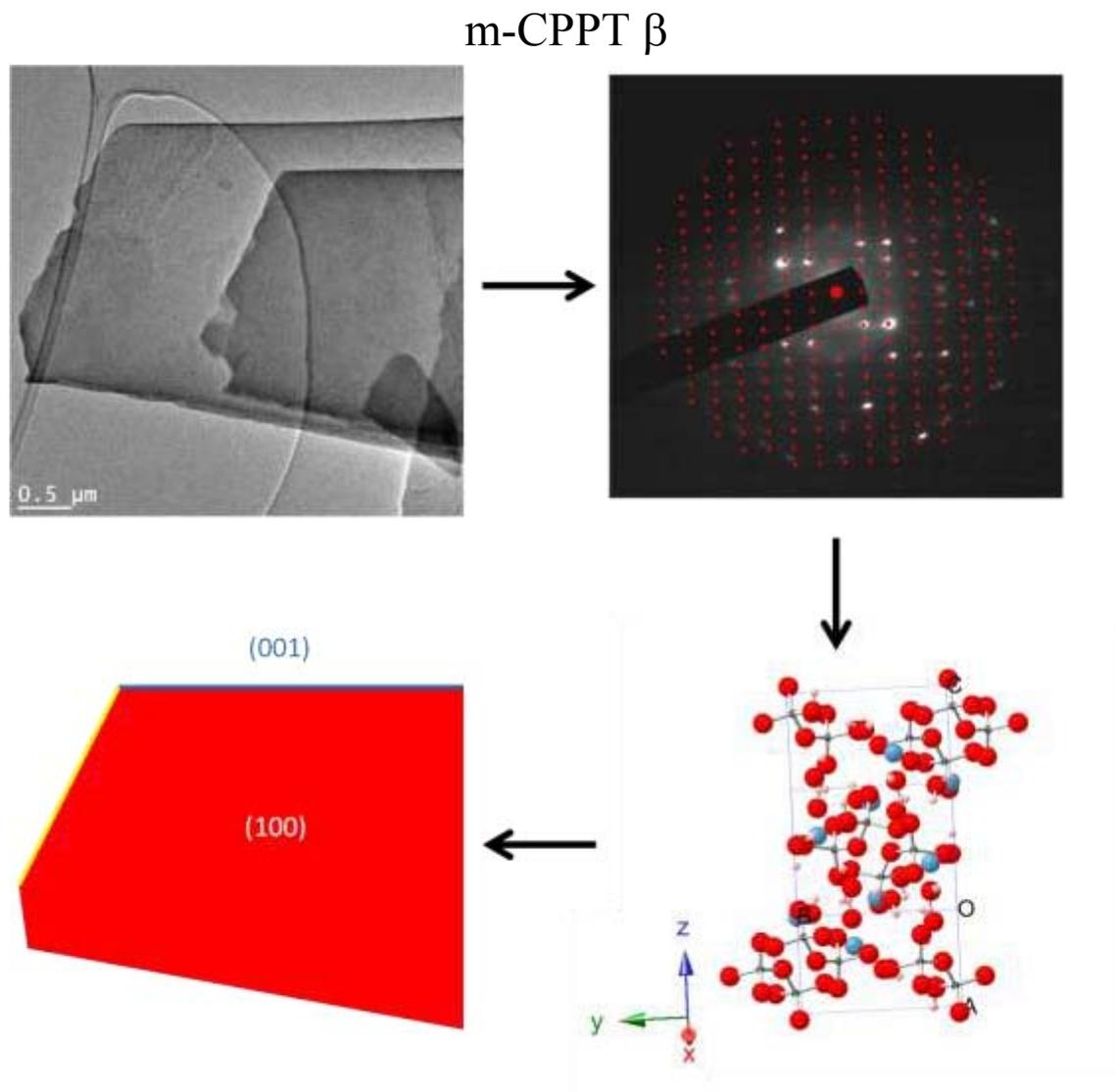


Figure III-37 : Morphologie d'un cristal de la phase m-CPPT β analysé par MET et diffraction électronique.

Les cristaux de la phase m-CPPT β observés se présentent sous forme de plaquettes possédant une face basale (100). Les bords des cristaux observés sont irréguliers et ne permettent pas une identification correcte. Aucun autre axe de zone que celui du plan (100) n'a été détecté. Ces irrégularités pourraient provenir de fractures produites lors de la préparation des échantillons, les agglomérats ayant été brisés lors du traitement par ultrasons pour disperser les cristaux en suspension.

Morphologie des cristaux de la phase m-CPPD

m-CPPD (100)

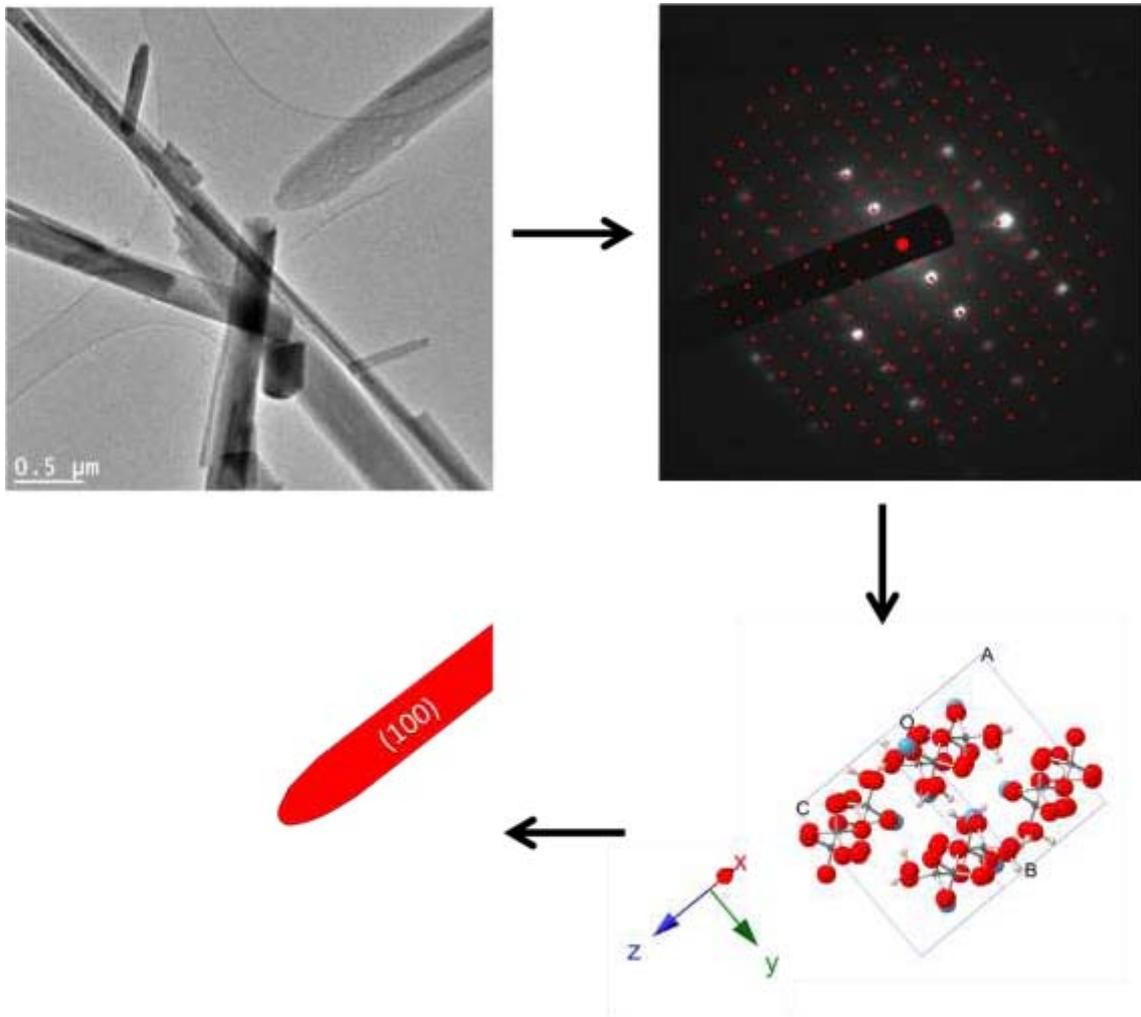


Figure III-38 : Morphologie d'un cristal de la phase m-CPPD analysé par MET et diffraction électronique.

Les cristaux de la phase m-CPPD observés se présentent sous forme d'aiguilles orientées suivant l'axe \vec{c} . Un axe de zone, correspondant à \vec{a}^* , a été détecté. Un deuxième motif est aussi présent sur les clichés de diffraction. Ce motif a été analysé à partir des différentes simulations et pourrait correspondre à un motif de diffraction sur un plan (110) (figure III-39).

m-CPPD (110)

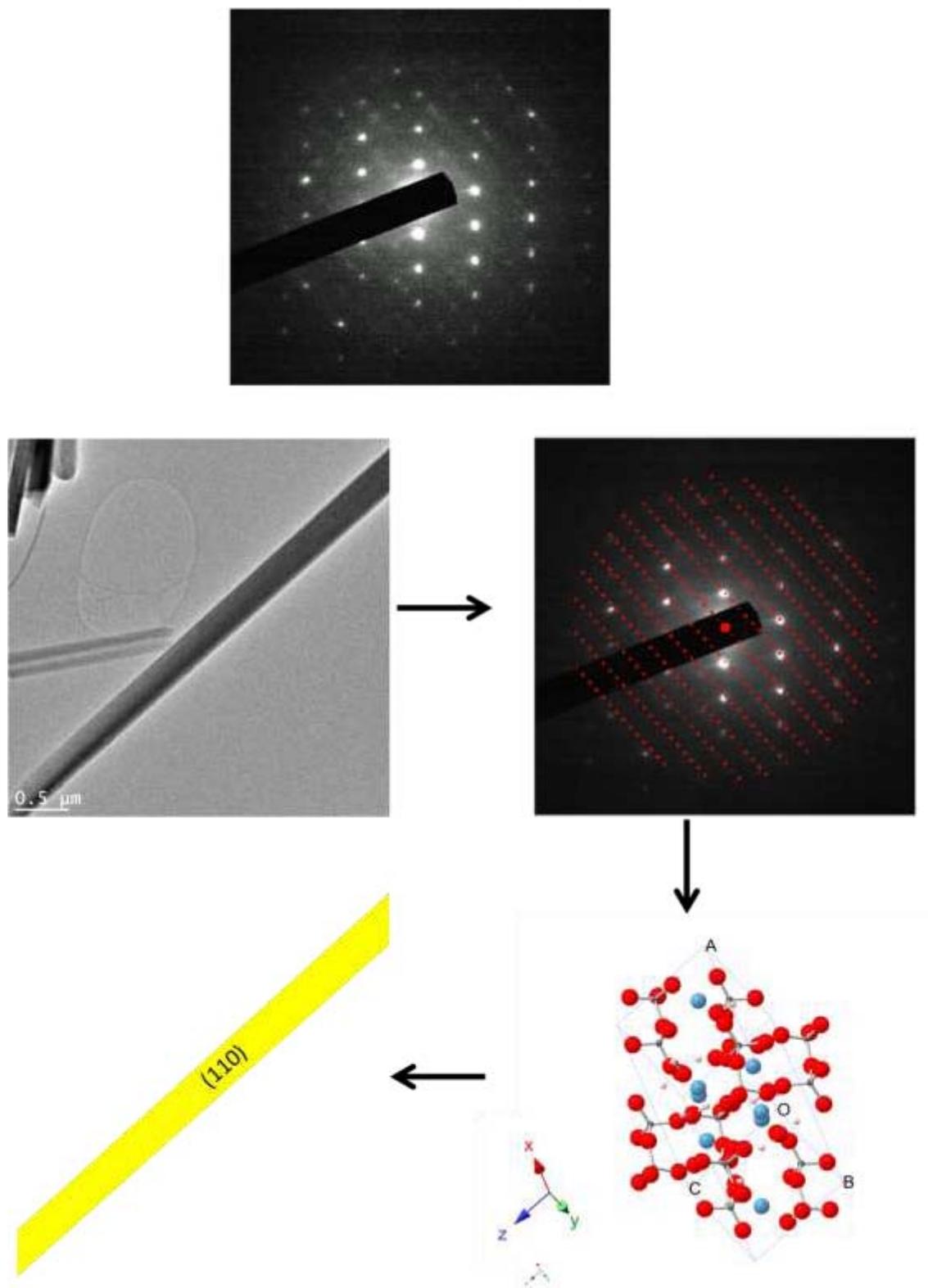


Figure III-39 : Morphologie d'un cristal de la phase m-CPPD analysé par MET et diffraction électronique.

Ces résultats sont donc en accord avec ceux obtenus par simulation *ab initio* des morphologies. La difficulté d'analyse, l'évolution des cristaux sous le faisceau et la faible qualité de ceux-ci ne permettent cependant pas d'exclure d'autres orientations. De nombreux clichés de diffraction électronique obtenus sur des cristaux de la phase m-CPPD particulièrement n'ont pu être analysés du

fait de leur très mauvaise qualité.

C3. Fonctions de Fukui et potentiel inflammatoire

La morphologie des cristaux ayant été décrite, le but est maintenant de déterminer de manière qualitative la réactivité de surface de chacune de ces faces. Plusieurs méthodes sont utilisées pour estimer cette réactivité de surface en utilisant la charge atomique, les valences libres ou le Laplacien de la densité de charge. Nous utiliserons ici la théorie des orbitales frontières de Fukui afin d'estimer la réponse du système à une attaque de nature nucléophile ou électrophile.

(1) Fonctions de Fukui

Les fonctions de Fukui, développées par Parr & Yang [Parr & Yang, 1989], mesurent la sensibilité de la densité de charge $\rho(r)$ à perdre ou gagner des électrons d'après les formules (III-3) et (III-4) :

$$f^+(r) = \frac{1}{\Delta N} (\rho_{N+\Delta N}(r) - \rho_N(r)) \quad (\text{III-3})$$

$$f^-(r) = \frac{1}{\Delta N} (\rho_N(r) - \rho_{N-\Delta N}(r)) \quad (\text{III-4})$$

Nous utiliserons ces fonctions afin d'estimer les sites préférentiels d'interaction avec les molécules du solvant et donc réaliser une première étape avant une modélisation dynamique. Les calculs ont été ici effectués avec une interface en contact avec le vide.

(2) Sites potentiels d'attaques nucléophiles et électrophiles sur les différentes surfaces des cristaux de CPP.

Les différents sites ont été évalués par les calculs des fonctions de Fukui par le module DMol3 du logiciel *Materials Studio*. Les fonctions « nucléophiles » f^+ sont représentées avec un isopotential de $1,5 \text{ e}\cdot\text{\AA}^{-3}$ et les fonctions « électrophiles » f^- avec un isopotential de $0,5 \text{ e}\cdot\text{\AA}^{-3}$. Les sites présentés par la fonction f^+ seront particulièrement intéressants pour repérer les sites potentiels d'attaque ou d'adsorption de molécules chargées négativement tels que les phosphates, le groupement phosphate des molécules de phospholipides, les molécules de citrate ou autres molécules d'intérêt biologique. Les fonctions f^+ permettent de repérer les sites pouvant interagir notamment avec la fonction alcool azoté des molécules de phospholipides.

La représentation des courbes d'isopotentiels (fonctions de Fukui) de la surface des cristaux de t-CPPD, m-CPPD et m-CCPT β sont présentées respectivement sur les figures III-40 et III-41, III-42 et III-43 et enfin sur la figure III-44.

Surface des cristaux de la phase t-CPPD

La présence d'ions pyrophosphate en surface des différentes faces est compatible avec la mesure du potentiel zéta relevé par Winternitz *et al.* de -35 ± 4 mV dans l'eau distillée jusqu'à -44 ± 3 mV en présence d'un tampon phosphate [Winternitz *et al.*, 1996]. Les ions calcium se situent au sein de la structure, en retrait par rapport à la surface composée de molécules d'eau et de pyrophosphate (figure III-40). Ils ont ainsi peu d'influence sur la surface de Connolly avec un rayon de Connolly de $0,8 \text{ \AA}$ ou sur la surface accessible au solvant avec un rayon de $1,4 \text{ \AA}$ (figure III-41).

Les fonctions de Fukui forment ici des lobes dont les isopotentiels sont particulièrement développés. Les densités supérieures à $0,5 \text{ Ha} \cdot \text{\AA}^3$ sont ainsi présentes au-delà de la couche accessible au solvant pour les fonctions électrophiles et nucléophiles. Elles sont issues de l'orientation en double couche des atomes de calcium et des molécules de pyrophosphate. Les fonctions issues de la face (100) notamment sont étendues le long de ces doubles couches. Cette organisation pourrait faciliter l'interaction avec des molécules extérieures chargées.

t-CPPD

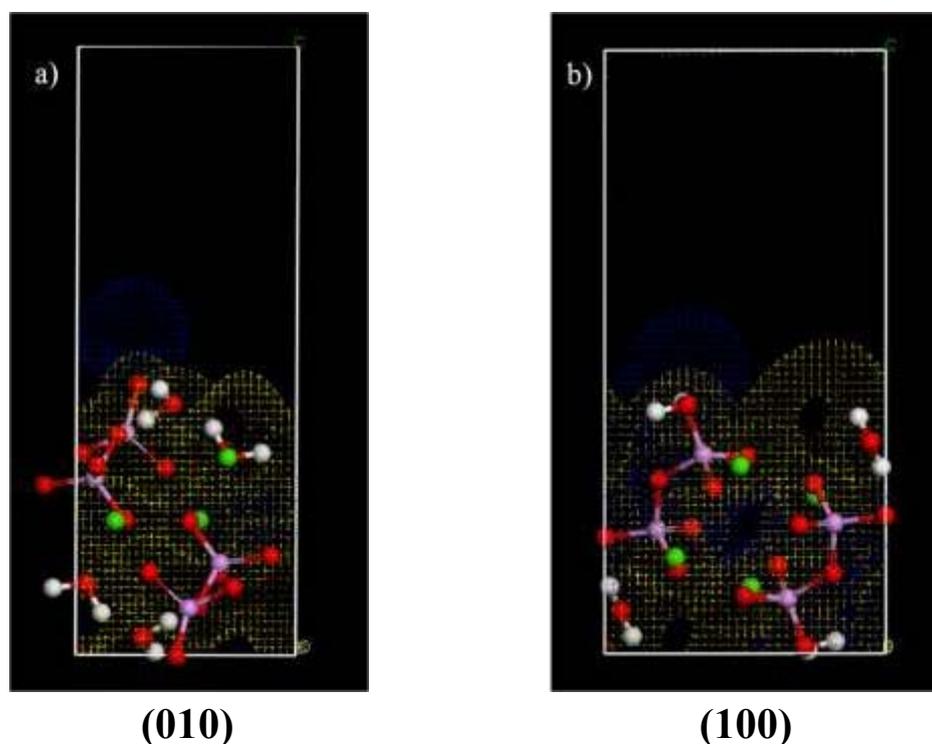
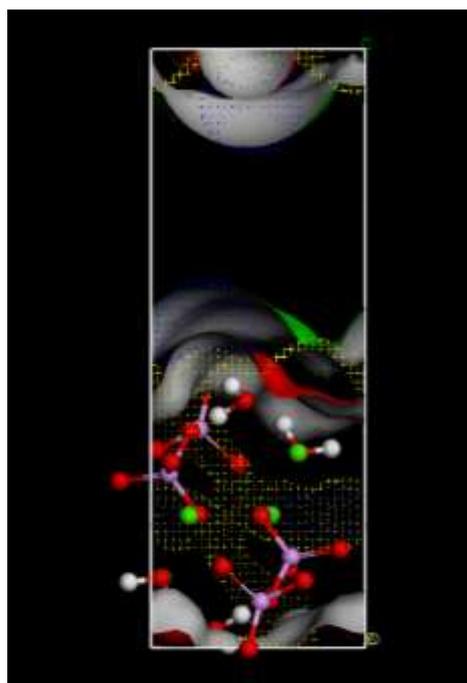


Figure III-40 : Isopotentiels fonctions de Fukui électrophile (jaune) et nucléophile (bleu) de la phase t-CPPD.

t-CPPD



(010)

Figure III-41 : Isopotentiels fonctions de Fukui électrophile (jaune) et nucléophile (bleu) de la phase t-CPPD. La surface de Connolly (0,8 Å) est représentée en rouge et la surface de solvant (1,4 Å) est représentée en vert.

Les fonctions nucléophiles possèdent une densité maximale de $1,5 \text{ Ha} \cdot \text{Å}$ en des point situés sur l'un des sommets des molécules de pyrophosphate en surface. Un seul site est détecté par maille, ces sites sont séparés au minimum d'une distance égale au paramètre c , soit $6,7 \text{ Å}$ pour les deux faces présentées.

Ces résultats sont en accord, qualitativement, avec les résultats obtenus par Wierzbicki et Cheung sur les sites d'adsorption de molécule phosphocitrate à la surface de cristaux de t-CPPD [Wierzbicki & Cheung, 1998]. Les simulations dynamiques en présence de solvant, l'eau, ont depuis renforcé le modèle d'adsorption de molécules à la surface de cristaux de t-CPPD. Le but étant maintenant de tester cette hypothèse par un modèle simple pour les autres phases de CPP.

Surface des cristaux de la phase m-CPPD

La présence d'ions pyrophosphate en surface des différentes faces est compatible avec la mesure du potentiel zéta relevé par Winternitz *et al.* de $-19 \pm 2 \text{ mV}$ dans l'eau distillée [Winternitz *et al.*, 1996]. Les ions calcium se situent ici plus proches de la surface, notamment sur la face (100). Ils sont ainsi directement accessibles par le milieu comme le montre la surface de Connolly ou sur la surface accessible (figures III-42 et III-43).

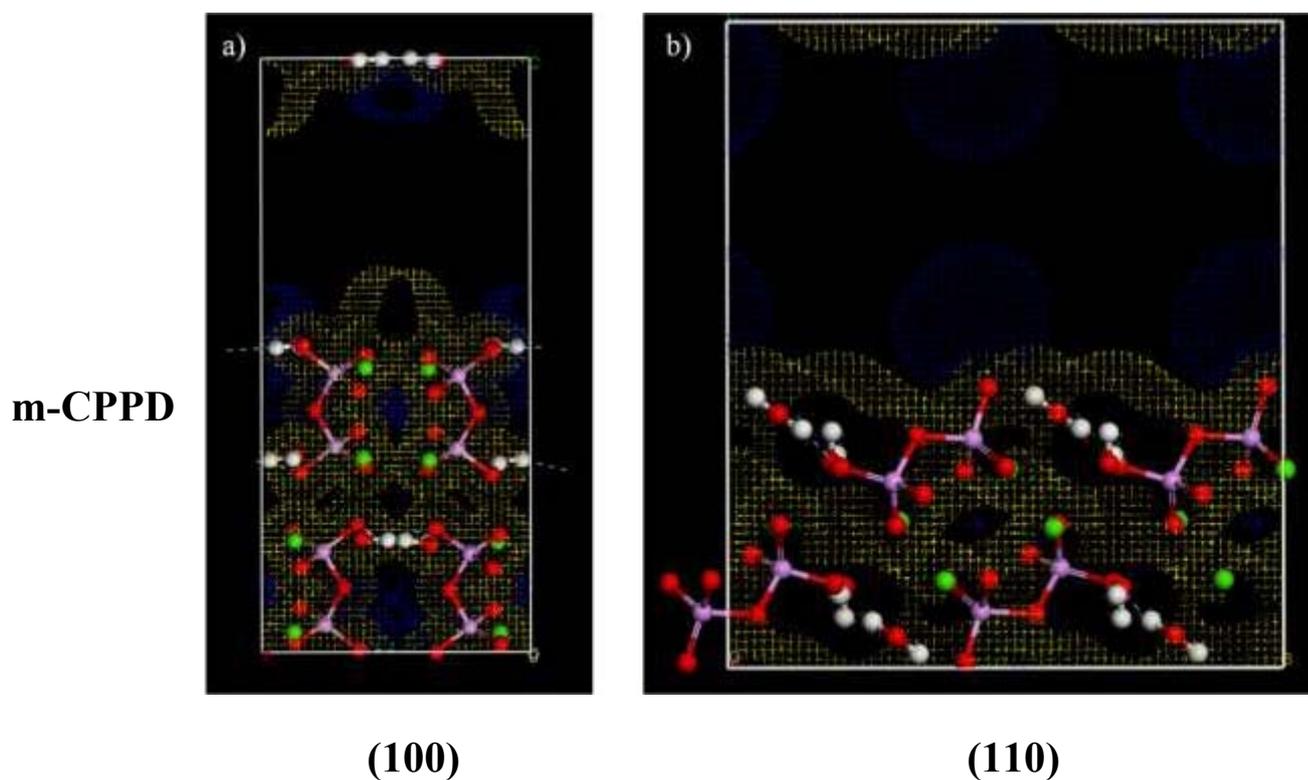


Figure III-42 : Isopotentiels fonctions de Fukui électrophile (jaune) et nucléophile (bleu) de la phase m-CPPD.

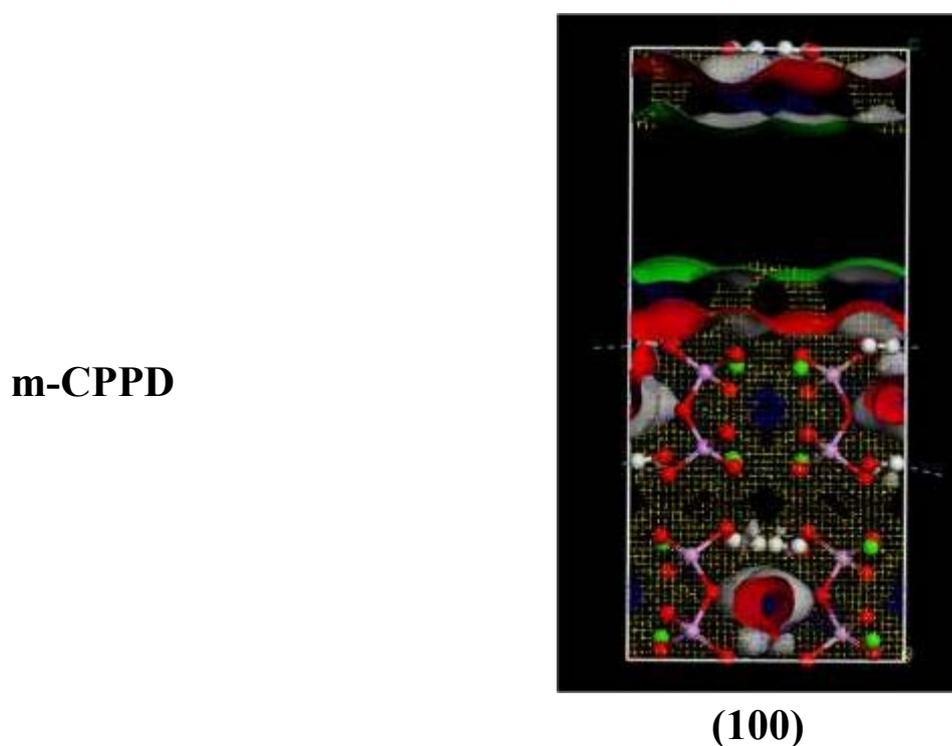


Figure III-43 : Isopotentiels fonctions de Fukui électrophile (jaune) et nucléophile (bleu) de la phase m-CPPD. La surface de Connolly (0,8 Å) est représentée en rouge et la surface de solvant (1,4 Å) est représentée en vert.

Les fonctions de Fukui forment ici aussi des lobes dont les isopotentiels sont particulièrement développés. Les densités supérieures à $0,5 \text{ Ha} \cdot \text{Å}^3$ sont ainsi présentes au-delà de la couche accessible

au solvant pour les fonctions électrophiles et nucléophiles. Elles sont issues de l'orientation en double couche des atomes de calcium et des molécules de pyrophosphate présentes aussi dans cette structure. Cette organisation pourrait là aussi faciliter l'interaction avec des molécules extérieures chargées d'autant que les fonctions de Fukui forment des continuums le long de l'axe c sur la face (100).

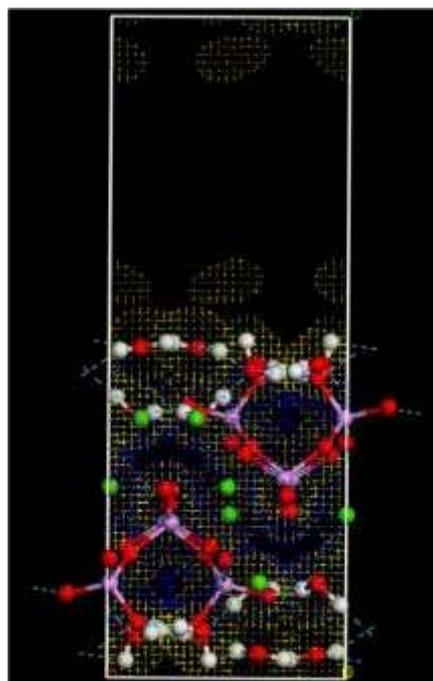
Les fonctions nucléophiles et électrophiles possèdent une densité maximale de $1,0 \text{ Ha}\cdot\text{\AA}$ le long de ces continuums reliant les atomes de calcium de surface d'une part et les molécules de pyrophosphate d'autre part. Deux sites sont présents par maille séparés de $4,3 \text{ \AA}$ pour les sites reliés aux molécules de pyrophosphate et $4,0 \text{ \AA}$ pour les calcium. Ces distances sont compatibles avec une adsorption de petites molécules (citrate, phosphocitrate, thiosulfate, bisphosphonate, ...) sur les deux sites simultanément. Les distances entre calcium et pyrophosphate sont plus courtes, $2,4 \text{ \AA}$ comparé à 4 \AA pour les faces (100) et (010) de t-CPPD et la face (110) de m-CCPD, pour permettre l'adsorption d'espèces amphotères comme les phospholipides. La face (100) pourrait donc présenter des propriétés d'interaction avec son milieu favorisant le développement d'un potentiel inflammatoire plus marqué.

La face (110) de la phase m-CPPD présente des propriétés comparables aux faces de t-CPPD avec des distances entre sites de $6,8 \text{ \AA}$ et des atomes de calcium n'interagissant que faiblement en surface.

Surface des cristaux de la phase m-CPPT β

La surface des cristaux de m-CPPT β est majoritairement constituée des faces $\{100\}$, présentant une surface riche en molécules d'eau. Cette organisation particulière, dans laquelle les molécules d'eau sont fortement liées à la structure, pourrait expliquer le faible potentiel inflammatoire de cette phase. Les différents potentiels représentés sont de faible amplitude et se situent à proximité de la surface (figure III-48). Cette structure présente ainsi la limite du modèle utilisé, les potentiels calculés en présence de molécules d'eau en surface dans le vide ne permettant qu'une approximation des phénomènes se situant à proximité immédiate de la surface du cristal. Des simulations dynamiques pourraient quantifier l'influence de cette couche d'eau sur l'adsorption de molécules.

m-CPPT β



(100)

Figure III-44 : Isopotentiels fonctions de Fukui électrophile (jaune) et nucléophile (bleu) de la phase m-CPPT β .

L'ensemble de ces résultats pourraient expliquer le potentiel inflammatoire plus développé des cristaux de la phase m-CPPD par rapport à ceux des phases t-CPPD et m-CPPT β . Ces résultats ne constituent cependant qu'une piste dans l'analyse de la surface des différents cristaux et des simulations prenant en compte un milieu plus complexe devront être effectuées afin de mieux relier le potentiel inflammatoire à la morphologie et à la chimie de surface de ces cristaux.

D. Conclusions

Ce chapitre s'est attaché à décrire les cristaux de pyrophosphate de calcium hydraté, par la détermination de leur structure et de leur morphologie, mais aussi par leur caractérisation à travers différentes méthodes spectroscopiques pouvant être appliquées au diagnostic de dépôt de pyrophosphate de calcium.

Les différentes structures des phases de CPP hydratées ont été résolues en combinant différentes techniques diffraction des rayons X, diffraction des neutrons, modélisation *ab initio*. Cette approche a notamment permis la résolution de la structure de la phase m-CPPD, possédant un intérêt biologique majeur, et la description complète de plusieurs autres phases telles que m-CPPT β , une phase monohydratée m-CPPM et t-CPPD.

Les structures obtenues ont aussi permis une meilleure description des caractéristiques physico-chimiques des phases CPP, notamment dans la révision de l'attribution des bandes de spectroscopie vibrationnelle, des signaux de résonance magnétique nucléaire ^{31}P et ^{43}Ca ainsi que de la morphologie des cristaux.

Des premiers résultats sur la réactivité de surface ont permis de définir des sites d'interaction possible entre les cristaux et leur milieu, pouvant à terme aider à la compréhension des mécanismes liés au potentiel inflammatoire de ces cristaux *in vitro* et *in vivo*.

Chapitre IV

Evolutions et transformations de phases de
pyrophosphate de calcium hydratés

Ce chapitre s'attachera à décrire les évolutions de pyrophosphates de calcium hydratés (CPP : $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) en solution et durant leur déshydratation. L'objectif principal des expériences décrites dans ce chapitre est d'établir clairement les différentes évolutions en milieu aqueux et à haute température des phases de CPP hydratées dont la synthèse et la caractérisation ont été décrites dans les chapitres II et III. Plusieurs protocoles ont été mis en place afin d'étudier les changements de phase en fonction de différents paramètres comme la température, l'acidité, le régime d'agitation ou l'atmosphère, et ainsi définir ces évolutions dans des conditions les plus variées possibles. De même les déshydratations successives des composés étudiés ont été analysées au moyen de différentes techniques complémentaires. Plusieurs phénomènes seront de plus étudiés comme les mécanismes de croissance de cristaux ou d'agglomérats ou encore la réactivité des phases formées. L'ensemble de ces travaux devrait permettre d'améliorer la connaissance de ces systèmes et d'établir des parallèles avec les observations faites *in vivo*.

A. Cristallisation et évolution des phases de CPP

A1. Evolution de la phase amorphe

A1 a) Etat de l'art

Les évolutions de la phase amorphe de pyrophosphate de calcium (a-CCP) observées *in vitro*, vers les phases m-CPPT β , m-CPPD et t-CPPD, sont notamment à relier à la formation de calcifications *in vivo* [McCarty *et al.*, 1966]. L'étude de son évolution peut aider à la compréhension du développement des maladies à cristaux de pyrophosphate de calcium bien que la phase amorphe n'ait pas été observée dans les articulations de patients arthritiques, en partie par manque de méthode de caractérisation adaptée [Liu *et al.*, 2009].

Plusieurs évolutions des phases de pyrophosphate de calcium hydraté ont été décrites dans la littérature suivant les conditions d'acidité, de température ou de concentration utilisée [Brown *et al.*, 1963; Mandel *et al.*, 1988; Christoffersen *et al.*, 2000; Gras *et al.*, 2013b]. Ces évolutions correspondent soit à des changements de phases, notamment l'évolution de la phase m-CPPT β en t-CPPD en milieu acide, soit à des évolutions morphologiques de ces composés ; la phase t-CPPD ayant été décrite sous forme d'aiguilles ou de colonnes [Brown *et al.*, 1963; Christoffersen *et al.*, 2001, 2002]. Plusieurs méthodes de synthèse parmi les plus répandues s'appuient notamment sur l'évolution de la phase amorphe, dans des conditions d'acidité et de température particulières, afin de synthétiser différentes phases de pyrophosphate de calcium d'intérêt biologique, tels que le t-CPPD [Brown *et al.*, 1963; Cheng *et al.*, 1980; Mandel *et al.*, 1984]. Les évolutions de la phase amorphe n'ont cependant

pas été décrites dans des domaines de pH et de température étendus.

Les premières descriptions de la phase amorphe de pyrophosphate de calcium font état de sa très grande stabilité comparée à d'autres phases minérales amorphes d'intérêt biologique tels que les phosphates de calcium et les carbonates de calcium amorphes [Slater *et al.*, 2011]. Dès 1847, les phases amorphes de composés de pyrophosphate sont décrites comme « persistants indéfiniment » en milieu neutre lorsqu'elles sont formées par mélange de solution de MCl_2 et $Na_4P_2O_7$, où M est un métal divalent [Baer, 1847; Bassett *et al.*, 1936]. Cette stabilité a été confirmée par Slater *et al.* dans le cas particulier des pyrophosphates de calcium et de strontium amorphes. Les phases sont décrites comme stables pendant une période prolongée, supérieure à 1 an, dans des conditions standards de température et pression de laboratoire [Slater *et al.*, 2011].

En dehors des conditions neutre ou basique, la phase amorphe subit plusieurs transformations. La phase évolue suivant les conditions opératoires vers des phases de pyrophosphate de calcium hydraté variées, jusqu'à la phase thermodynamiquement la plus stable, la phase t-CPPD en milieu acide [McCarty *et al.*, 1966]. Plusieurs conditions opératoires ont été notamment décrites par Brown *et al.* comme aboutissant à la formation des phases m-CPPT α , m-CPPT β , m-CPPD et t-CPPD [Brown *et al.*, 1963]. Outre quelques données sporadiques et partielles, aucune étude extensive de l'effet des conditions opératoires sur la phase amorphe n'est cependant disponible dans la littérature. Une limite haute de pH est indiquée pour la synthèse de la phase m-CPPD sans renseignement sur des limites éventuelles en température ou les phases obtenues dans des conditions basiques ou neutre. Dans ces dernières conditions, la synthèse a de plus été rapportée comme étant non reproductible, les échantillons comportant souvent plusieurs phases de CPP difficiles à isoler [Mandel *et al.*, 1988; Christoffersen & Christoffersen, 2003; Groves *et al.*, 2007]. Elle est de plus longue et elle ne permet pas la préparation d'une grande quantité de produit.

Cette partie s'attachera à décrire les évolutions de la phase amorphe sur une large gamme de pH et de température.

A1 b) Evolution de la phase amorphe en fonction du pH et de la température

Des échantillons de phase amorphe de CPP ont été synthétisés par l'ajout rapide des solutions de réactifs, 30 mL solution de calcium $[Ca^{2+}] = 150 \text{ mmol.L}^{-1}$ et 30 mL solution de pyrophosphate $[P_2O_7^{4-}] = 75 \text{ mmol.L}^{-1}$, directement synthétisées dans une solution tampon pH acétate d'ammonium ou TRIS (60 mL) au pH souhaité pour l'étude (entre pH 3,6 et pH 7,4). La solution de précipitation est ensuite placée dans une étuve à la température choisie pour l'étude (entre 25°C et 90°C) pendant deux

semaines en milieu statique (sans agitation). Les échantillons sont prélevés après deux semaines d'évolution puis filtrés et lavés avant d'être analysés par DRX, MEB et spectroscopie FTIR.

Les analyses par DRX et spectroscopie FTIR ont permis de caractériser les différentes phases de CPP ainsi obtenues. L'addition rapide des solutions de réactifs à température ambiante permet la formation d'une phase amorphe de pyrophosphate de calcium. Le diagramme présenté sur la figure II-7 met en évidence les phases formées en fonction du pH et de la température après évolution de la phase amorphe en solution pendant deux semaines. On retrouve les domaines correspondant aux phases observées lors de la synthèse sous agitation présentée dans le chapitre II, des mélanges de phases sont obtenus pour les conditions à l'extérieur de ces domaines. Ceux-ci sont cependant déplacés vers les basses températures. Ces domaines pourraient être en lien avec les différentes solubilités de chacune des phases : le t-CPPD qui est la phase de pyrophosphate de calcium la moins soluble ($pK_s = 18,35$) se forme à haute température et à pH acide alors que la phase amorphe a-CPP, la plus soluble, reste stable à des températures modérées et les pH les moins acides [Christoffersen *et al.*, 2000]. Un temps d'évolution plus long pourrait permettre la transition de la phase amorphe métastable vers des phases stables sous certaines conditions « douces ». Remarquons que dans nos expérimentations de durée nécessairement limitée, la phase amorphe reste stable dans les conditions de pH et de température physiologiques (37°C et pH 7,4).

Plus précisément, la phase amorphe est stable le temps de l'expérience pour des pH neutres à faiblement acides et des températures inférieures à 60°C (Figure II-7). La phase tétrahydratée se forme à des pH acides, entre pH 3,6 et 5,8 pour des températures inférieures à 50°C, tandis que les phases dihydratées sont formées à des températures supérieures ou égales à 50°C, sur toute la gamme de pH étudiée pour le t-CPPD et à pH restreint autour de 5,8 pour le m-CPPD. Il est à noter qu'au-delà de 60°C et pour des pH acides, les ions pyrophosphate $P_2O_7^{4-}$ subissent une hydrolyse en ions hydrogénophosphate HPO_4^{2-} . Cette hydrolyse en solution induit la formation de phases secondaires d'orthophosphate de calcium, notamment de brushite $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ et d'hydroxyapatite riche en hydrogénophosphate (zones hachurée sur la figure IV-1).

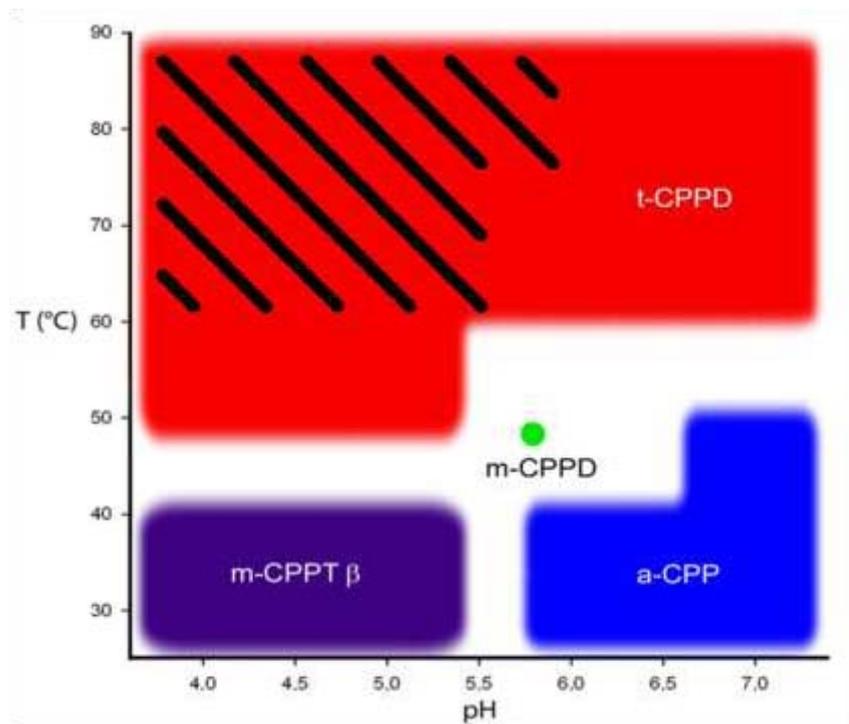


Figure IV-1 : Domaine de formation des quatre phases de CPP hydratés purs après maturation pendant 2 semaines de la phase amorphe, a-CPP, dans la solution de précipitation. Des mélanges de phases sont obtenus pour les conditions à l'extérieur de ces domaines. Les hachures indiquent les domaines où des ions HPO_4^{2-} ont été détectés des par infrarouge et des phases d'orthophosphates de calcium détectées par DRX.

Les observations par MEB mettent en évidence plusieurs faciès de cristaux suivant les conditions de pH et de température appliquées (figure IV-2). Les échantillons de phase amorphe présentent toujours le même faciès quelles que soient les conditions d'évolution. Les micrographies montrent des particules sous forme plutôt de sphère d'environ 100 nm de diamètre agglomérées sur plusieurs microns.

La phase m-CPPD n'est présente, après le temps d'analyse considéré et dans les conditions énoncées, qu'en un point du diagramme probablement du à la faible différence d'énergie de formation et de solubilité entre m-CPPD et t-CPPD. Les cristaux aciculaires sont agglomérés en fagots d'environ 50 μm dans leur dimension la plus grande. Les micrographies aux extrémités des fagots montrent des formes variées et mal définies ne permettant pas de préciser une morphologie. Certains cristaux semblent indiquer des formes parallélépipédiques, hexagonales ou tronquées ayant des tailles de l'ordre du micron. Notons que la présence de la phase m-CPPD a été observée lors de l'évolution à pH 5,8 et 70°C, mais pour des temps inférieurs à 1 semaine. Elle apparaît alors comme être une phase de transition vers la phase t-CPPD.

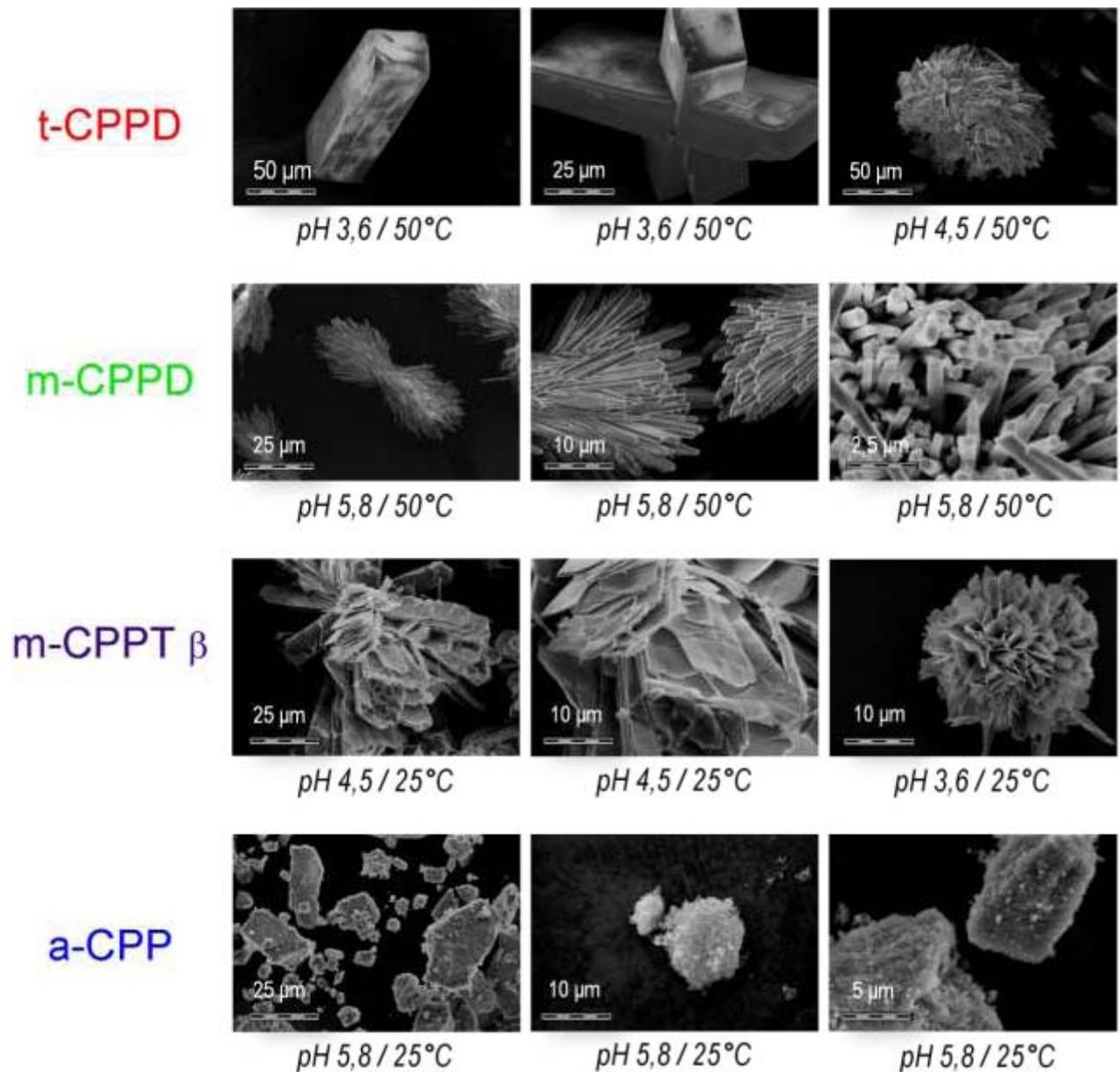


Figure IV-2 : Faciès des différentes phases formées à partir de a-CPP suivant les conditions d'évolution

Les variations de forme sont plus marquées pour les phases m-CPPT β et t-CPPD. Plusieurs morphologies et agglomérats ont été observés suivant les conditions d'évolution. Les cristaux de t-CPPD sont généralement plus développés avec des facettes plus marquées pour des pH plus acides. Des agglomérats sont plus présents à pH plus basiques. Les cristaux de t-CPPD synthétisés à pH 3,6 et 50°C présentent de nombreuses marches inclinées de taille importante, certains cristaux étant maclés (Figure IV-3). La proportion de marches est plus forte sur l'une des faces la plus développée du cristal, indexée (100) par Wierzbicki & Cheung [Wierzbicki & Cheung, 1998]. A pH 4,5 et 50°C, les cristaux formés ont des tailles réduites et sont réunis sous forme d'agglomérats d'environ 100 μm. Ils pourraient correspondre à des ensembles formés à partir d'un germe central, probablement à sursaturation relativement élevée et donc dans des processus de croissance cristalline rapides.

Les cristaux de la phase m-CPPT β sont facettés pour des conditions de pH plus basique, contrairement à ceux de t-CPPD, et de forme moins définie pour des pH plus acides. Les faciès facettés peuvent être reliés à ceux obtenus lors de la première étude (chapitre II). Les tailles de cristaux observées y sont cependant supérieures, variant jusqu'à 50 μm pour les cristaux obtenus à pH 4,6. Elles sont néanmoins inférieures à 10 μm pour les cristaux obtenus en condition de pH plus acide. Ces cristaux peuvent être présents sous forme d'agglomérats de différentes formes pour les deux faciès.

Les faciès des échantillons formés à plus haute température, au-delà de 60°C sont variables. Ils sont constitués de larges cristaux de t-CPPD avec la présence de plaquettes de brushite ou de d'agglomérats d'apatite formés à partir des ions orthophosphate produits par l'hydrolyse des molécules de pyrophosphate. Des cristaux de brushite de plusieurs millimètres ont ainsi été formés dans des conditions d'évolution correspondant à un pH de 5,8 et une température de 70°C.

AI c) Evolution à pH et température fixes

Plusieurs études complémentaires ont été réalisées dans des conditions particulières de pH et de température choisies dans le diagramme pH-T déjà présenté sur la figure IV-1 afin de comprendre les évolutions observées. Nous nous sommes intéressés à l'évolution de la phase amorphe sur une longue période dans les conditions de pH et de température physiologiques soit à pH 7,4 et 37°C pendant plus de deux ans, puis caractérisée par DRX et spectroscopie Raman.

Le résultat des analyses par spectroscopie Raman et diffraction des rayons X de la phase amorphe avant et après évolution sont présentés sur la figure IV-3. Aucun signe de cristallisation n'a été observé par DRX sur cet échantillon après deux ans. La présence d'orthophosphate, issu de l'hydrolyse de pyrophosphate, a cependant été observée par microscopie Raman (figure IV-3a), suggérant la présence d'une phase d'orthophosphate de calcium. Le diagramme DRX présente de plus un pic à 12,7°, soit 7,0 Å (Figure IV-4b), pouvant correspondre à la formation de composé amorphe.

Dans ces conditions, la cristallisation de l'échantillon ne pourrait avoir lieu que lors de la conversion complète des ions $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ en HPO_4^{2-} , formant potentiellement des orthophosphates de calcium cristallisés. Le mécanisme de formation de ces ions, par hydrolyse interne ou externe, n'a pas été élucidé ici. Le mécanisme d'hydrolyse externe, en solution, opère à températures relativement faibles et la formation de cristaux d'orthophosphate de calcium pourrait être inhibée par la présence de pyrophosphate. Outre la très grande stabilité des phases amorphes de pyrophosphate de calcium, la présence d'ions orthophosphate semble en effet jouer un rôle dans l'inhibition de la cristallisation

[Cheng & Pritzker, 1983]. Ce résultat pourrait indiquer que la phase amorphe se trouve sous forme stable dans les articulations, comme phase de pyrophosphate de calcium pure ou de mélange orthophosphate/pyrophosphate. Le développement de techniques de diagnostic adaptées à la détection de la phase amorphe apparaît alors primordial pour la compréhension de ses premiers stades de la maladie.

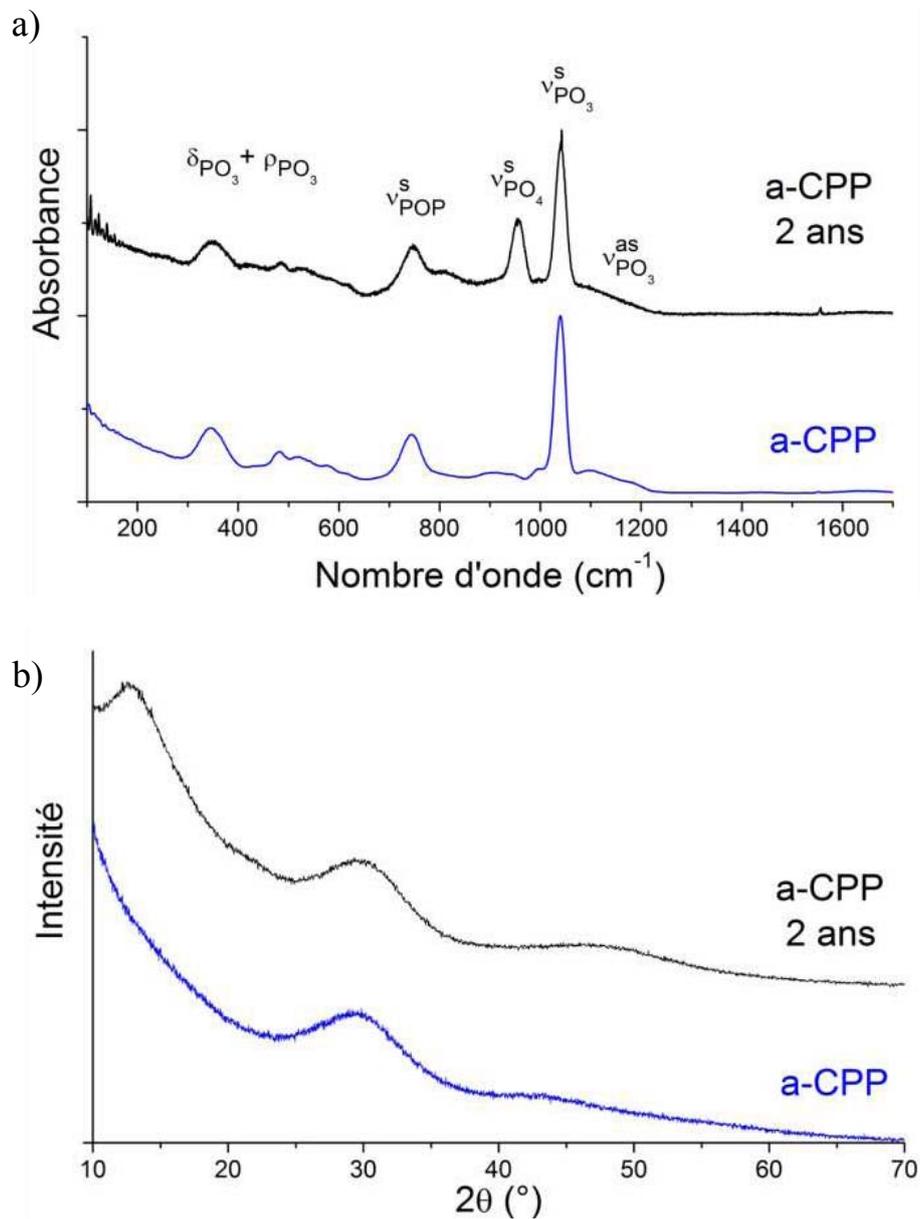


Figure IV-3 : Spectres Raman (a) et diagrammes DRX (b) de la phase amorphe (a-CPP) avant et après évolution à pH 7,4 et 37°C pendant deux ans.

Un autre point du diagramme pH -T (Figure IV-1) particulièrement intéressant à étudier correspond aux conditions de formation de la phase m-CPPD, à pH 5,8 et à température de 50°C. Ces conditions ont été étudiées pour deux raisons : le besoin de synthétiser des cristaux de dimension convenable pour une détermination de structure sur monocristal de cette phase et l'intérêt à connaître l'évolution de cette phase d'intérêt biologique pour mieux appréhender l'étude de cas cliniques et *in*

in vivo. Cette phase est en effet l'une des deux phases présentes *in vivo* et pourrait être un précurseur de la deuxième phase, le t-CPPD, plus stable. L'évolution de la phase amorphe vers la phase m-CPPD a été étudiée à différents temps afin d'analyser le plus finement possible les changements de phase et de morphologie de chacun des intermédiaires. Des échantillons ont été analysés après 1 heure, 1 jour, 2 jours, 3 jours, 1 semaine, 2 semaines, 1 mois et 3 mois de maturation dans la solution mère de précipitation. Les caractérisations ont été réalisées par spectroscopie FTIR et microscopie MEB (figures IV-4 et IV-5). Tous les échantillons ont été préparés le même jour à partir des mêmes solutions anionique et cationique puis filtrés et lavés après le temps de maturation considéré.

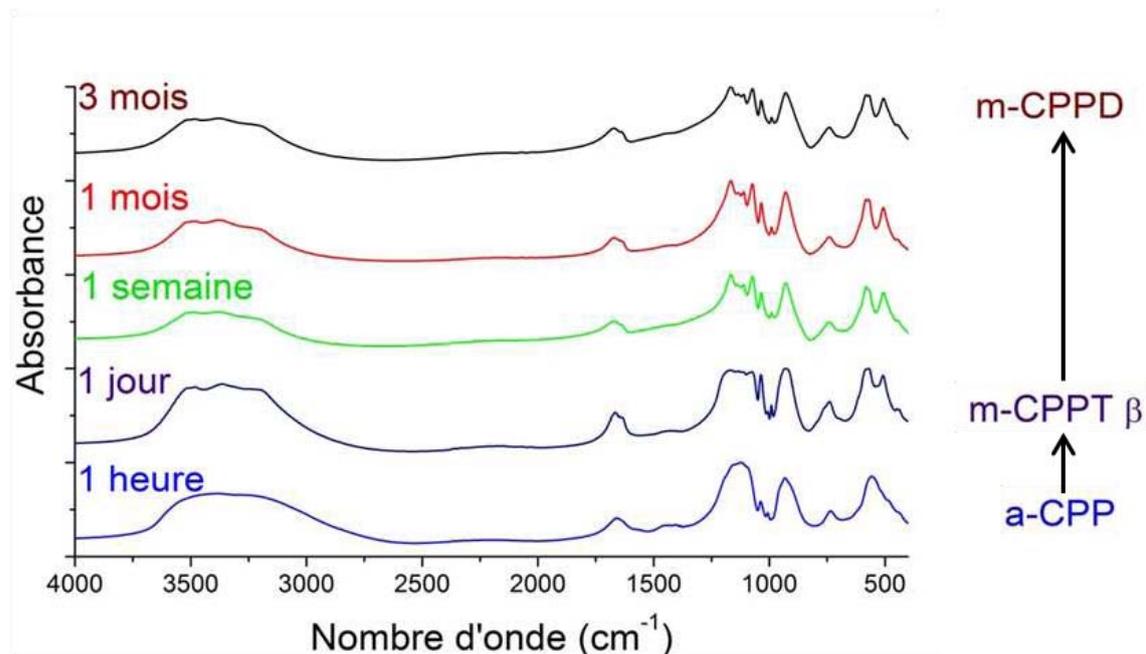


Figure IV-4 : Spectres d'absorption infrarouge montrant l'évolution de la phase amorphe après différents temps de maturation à pH 5,8 et température 50°C.

Les analyses par spectroscopie FTIR (figure IV-4) ont révélé la formation d'une phase m-CPPT β dès le premier jour de maturation puis l'évolution de cette phase vers la phase m-CPPD au cours de la semaine suivante ; elle reste ensuite stable au moins pendant 3 mois. Il est à noter que la phase m-CPPD est présente dès le premier jour puis devient la phase majoritaire après une semaine. Aucune autre phase n'a été détectée par spectroscopie FTIR après 1 semaine ni par diffraction de rayons X après 3 mois.

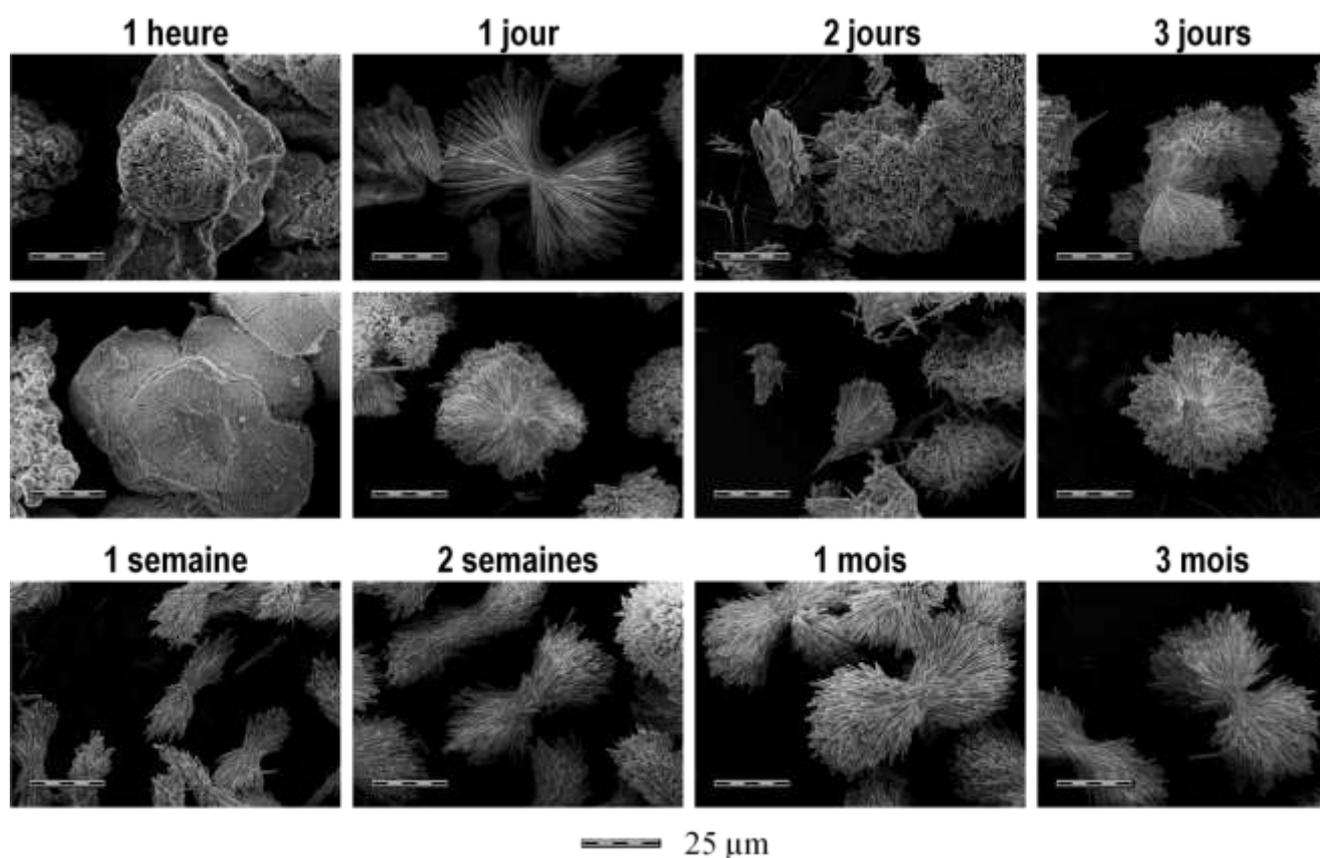


Figure IV-5 : Micrographies MEB montrant l'évolution de la phase amorphe après différents temps de maturation à pH 5,8 et température 50°C.

Les micrographies MEB (Figure IV-5) révèlent différentes évolutions au cours des 3 mois d'étude. La phase amorphe évolue rapidement, en moins d'une heure, pour donner des agglomérats de formes variées. L'observation microscopique réalisée à 1 heure révèle plusieurs ensembles mal définis. Des plaquettes peuvent être observées pouvant indiquer une évolution vers la phase m-CPPT β . Cette phase peut aussi être identifiée en spectroscopie FTIR par les faibles bandes caractéristiques observables superposées au signal de l'amorphe, notamment à 1250 cm^{-1} et diffraction des rayons X. La grande diversité de formes observées pourrait indiquer qu'une évolution directe de la phase amorphe vers la phase m-CPPT β est possible, sans phénomène de dissolution et précipitation. Certaines structures présentent en effet des profils intermédiaires granulaires et en couche, signe d'une transition par maturation de la phase.

Après un jour, la présence de la phase m-CPPT β est plus marquée ; elle a été mise en évidence aussi bien par microscopie MEB, par l'observation de plaquettes caractéristiques, que par spectroscopie FTIR que DRX. Les plaquettes se trouvent sous forme d'empilements simples ou d'agglomérats prenant la forme de sablier ou de fagots. Des aiguilles apparaissent aussi en grand nombre sous forme d'agglomérats sphériques. L'examen du spectre FTIR montre une faible proportion de phase m-CPPD, phase dont la morphologie cristalline déjà observée (cf. chapitre II)

correspondrait bien à ces fagots de cristaux aciculaires observés après un jour de maturation. Des sphères, brisées probablement lors de la filtration, présentent un cœur faiblement ordonné, probablement amorphe ou faiblement cristallisé (figure IV-6). Cette organisation peut être reliée aux sphérulites de type 1 décrites par Gránásy *et al.* [Gránásy *et al.*, 2005].

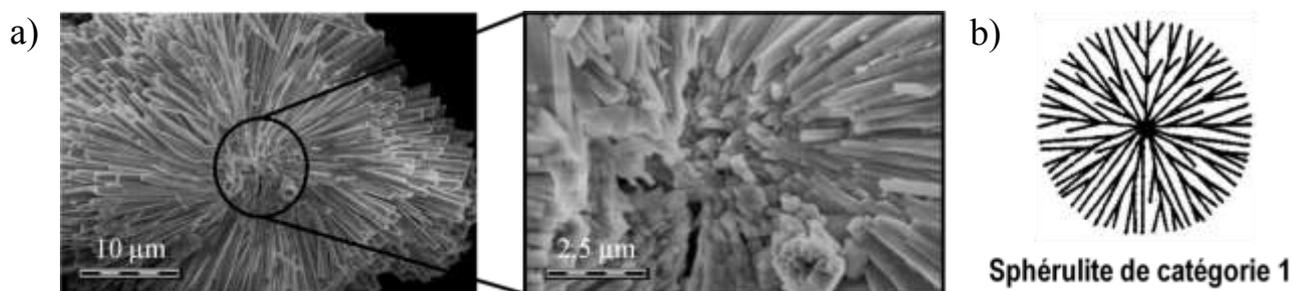


Figure IV-6 : a) Micrographies d'une demi-sphère de m-CPPD formée après un jour à pH 5,8 et à 50°C. b) Cet agglomérat peut être relié à une structure sphérulitique de catégorie 1, adaptée de Gránásy *et al.* [Gránásy *et al.*, 2005]

Les sphérulites se forment généralement lorsque les forces motrices, dans notre cas la sursaturation, sont relativement élevées et/ou que les cristaux sont fortement orientés [Gránásy *et al.*, 2005]. Ces constatations sont en accord avec le faciès aciculaire des cristaux de m-CPPD et leur faible solubilité ($pK_s = 17,6$) bien qu'aucune donnée de concentration n'est disponible à 50°C [Christoffersen *et al.*, 2000]. La taille des cristaux constituant la sphérulite ainsi que la densité d'embranchements dépendent de la sursaturation. A faible sursaturation, la sphérulite présente un faible nombre d'embranchements ainsi que de grands cristaux. Nous observons dans notre cas un nombre limité d'embranchements avec des cristaux de taille supérieure à 10 μm pouvant suggérer une sursaturation modérée.

L'analyse des échantillons aux jours 2 et 3 montre une diminution du nombre de cristaux plaquettaires de m-CPPT β et une augmentation de sphérulites brisées de m-CPPD. Les micrographies révèlent plus de sphérulites fractionnées, avec des fragments moins importants. Tandis que l'observation après un jour de maturation révélait principalement des sphères complètes ou des demi-sphères, celle des cristaux obtenus au-delà de un jour de maturation met en évidence plus de cristaux individuels ou des parties asymétriques de sphérulites. L'organisation de ces parties reste cependant similaire, avec une partie centrale faiblement cristallisée.

Les multiples fragments pourraient vraisemblablement être formés lors de l'étape de filtration et lavage avant l'analyse. Il pourrait cependant indiquer une fragilisation du cœur, probablement par cristallisation. Certains fragments présentent des cristaux formés sur la partie centrale et

orthogonalement au reste de la sphérulite. Ils peuvent indiquer une brisure antérieure à la filtration puis une croissance sur la partie centrale de cristaux de m-CPPD nouvellement formés. Cette période correspond aussi à la disparition de la contribution de l'amorphe sur les spectres FTIR, entre 3 et 7 jours de maturation.

L'observation MEB après une semaine révèle des agglomérats différents de ceux des jours précédents, avec une homogénéisation de l'échantillon. Les structures sphériques des jours précédents sont remplacées par des agglomérats en forme de sablier ou de fagot, similaires à ceux observés pour la phase m-CPPT β au jour 1. Notons que certains cristaux individuels restent visibles au jour 7, sans qu'aucun agglomérat brisé ne puisse être observé par MEB. Les agglomérats s'élargissent au cours de l'expérience pour former, sur certains, deux demi-sphères après 3 mois. Les changements de phases n'étant plus détectables, seule la phase m-CPPD est présente et ce dès le jour 7, cette évolution des agglomérats pourrait être reliée à un murissement d'Ostwald favorisant une diminution de surface spécifique.

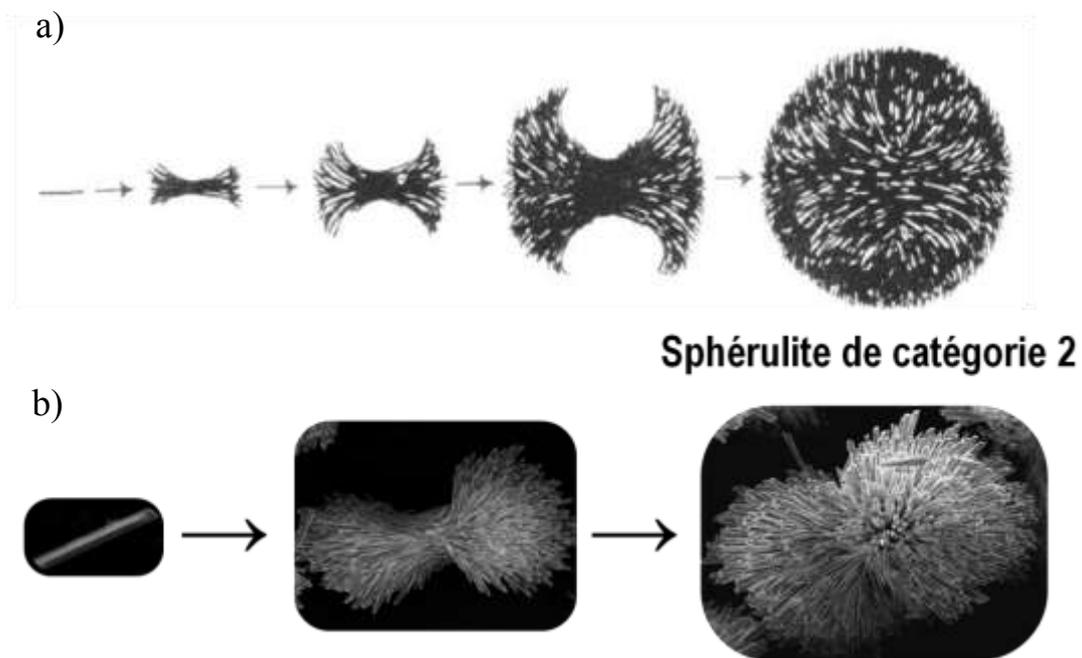


Figure IV-7 : a) Schéma de formation de sphérulite de type 2 adapté de Gránásy *et al.* et b) micrographies MEB montrant l'évolution d'agglomérats de m-CPPD observés à différents temps d'évolution : 2 jours, 1 semaine et 3 mois [Gránásy *et al.*, 2005]

Une évolution de la morphologie a donc pu être observée par MEB avec la formation d'agglomérats en forme de sablier. Les agglomérats observés dans le cas de la phase m-CPPD, présentés sur la figure IV-7, ont pu être reliés à des sphérulites de type 2 décrites par Gránásy *et al.*

[Gránásy *et al.*, 2005]. La formation de ces structures correspond à des mécanismes de croissance se basant sur la formation initiale d'un cristal, aciculaire dans le modèle, suivie par la croissance de la sphérulite par germination hétérogène aux extrémités des aiguilles formées. Les cristaux initiaux pourraient provenir de sphérulites de type 1 décomposées. La formation de sphérulites de type 1 est énergétiquement plus favorable, en cas de compétition, que la formation de sphérulites de type 2. Elle nécessite cependant un noyau non orienté pour se former. La taille de la sphérulite de type 2 augmente ensuite au cours du temps, autant par le recouvrement de l'espace formé entre les deux demi-sphères la constituant que par l'augmentation de la taille des cristaux composants la sphérulite, jusqu'à ce que la sphérulite devienne complète. La formation des sphérulites est reliée à une sursaturation élevée lors de la formation initiale puis à un murissement global des sphérulites et/ou, comme pour les sphérulites de type 1, à une forte orientation des cristaux.

La formation de deux catégories de sphérulites à partir de cristaux aciculaires de m-CPPD pourrait indiquer que ces agglomérats se développent à des valeurs de sursaturation en solution relativement faible pour cette phase. Une affinité particulière de cristaux pour ces types de croissance, de part leur morphologie ou leur affinité de surface, est aussi probable. Ces mécanismes ne favorisent pas la formation de monocristaux de taille suffisante pour l'utilisation en diffraction des rayons X sur monocristal en laboratoire, nécessitant au moins 100 μm sur une des dimensions du cristal. Associé à un domaine étroit de conditions favorables à la formation de phase pure, ces difficultés peuvent expliquer que la structure de la phase m-CPPD n'est pas encore été élucidée.

La croissance des cristaux a été poursuivie dans un deuxième temps par évaporation complète du solvant après formation des premières sphérulites, après 2 semaines d'évolution (figure IV-8). Les sphérulites se développent jusqu'à formation de demi-sphères complètes. La spectroscopie Raman indique que les cristaux obtenus correspondent majoritairement à la phase m-CPPD, avec présence d'autres signaux, notamment d'acide acétique, provenant de la solution de maturation tampon acétate probablement en surface des cristaux. Les cristaux sont mieux définis, des cristaux de 20 μm ayant été mesurés avec une section hexagonale de plusieurs microns. Les sphérulites semblent suffisamment solides pour ne pas se désagréger lors d'un traitement en bain ultrason.

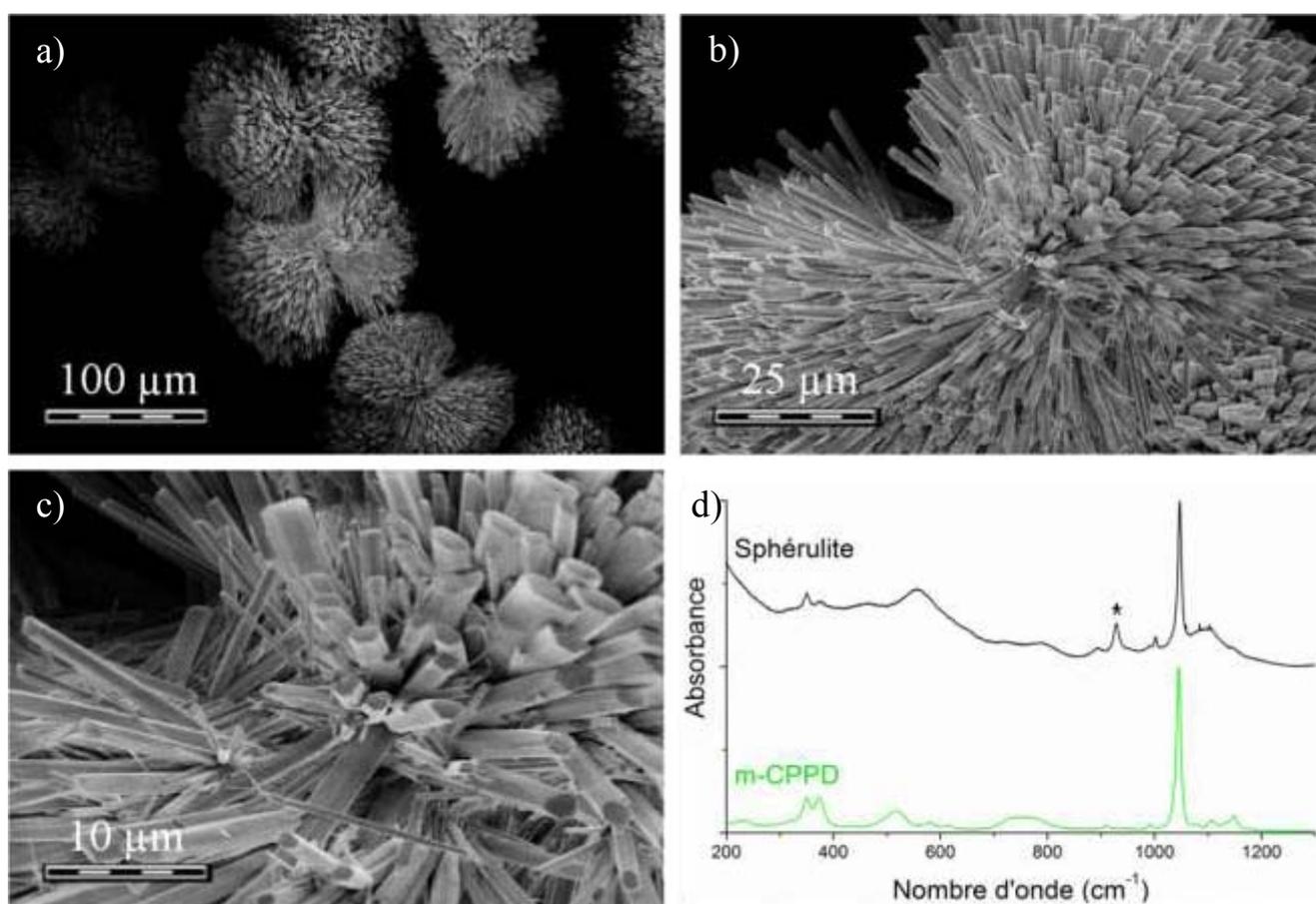


Figure IV-8 : a), b) et c) Micrographies MEB de sphérulites après évaporation totale de la solution de maturation après 2 semaines d'évolution et d) spectres Raman des cristaux comparés au spectre de la phase m-CPPD pure (* correspond à l'acide acétique).

La micrographie après 1 jour (Figure IV-5) pourrait de plus indiquer que ce mécanisme pourrait se généraliser à des cristaux au faciès plaquettaire. On observe en effet une organisation proche de la sphérulite sur plusieurs agglomérats de cristaux de m-CPPT β , pouvant correspondre à une croissance hétérogène de plaquettes aux extrémités d'un cristal primaire. On observe d'ailleurs des structures similaires, mais de taille réduite, sur la micrographie de l'échantillon mûri 1 heure (Figure IV-5). L'observation de sphérulite formé à partir de plaquette ne semble cependant pas avoir été reportée dans la littérature.

La phase m-CPPD est stable trois mois dans la solution mère à 50°C et pH 5,8, le pH ayant été vérifié à la fin de l'expérience. Aucune autre phase cristallisée de pyrophosphate ou d'orthophosphate de calcium n'est observée par spectroscopie FTIR, malgré le temps prolongé de l'expérience en condition acide.

A2. Synthèse en gel : cellule de diffusion

La synthèse de cristaux de taille supérieure à 100 μm nécessite un contrôle fin de la sursaturation afin de favoriser les mécanismes de croissance au détriment des mécanismes de germination. Ce contrôle de la sursaturation lors de la cristallisation peut être effectué par un contrôle de la concentration en solution, notamment par un dispositif de croissance cristalline à concentration constante (C4), ou par la maîtrise du gradient de concentrations à proximité des germes. Nous présenterons dans cette partie un dispositif de synthèse de cristaux en gel, la diffusion des réactifs étant contrôlée par les contraintes physiques et propriétés du gel, permettant la croissance régulière des cristaux à l'intérieur du gel. Cette section a été réalisée en collaboration avec Sébastien Teychené et Béatrice Biscans du Laboratoire de Génie Chimique, Toulouse.

A2 a) *Etat de l'art*

Outre les systèmes en solution, les synthèses de cristaux en gel ont été largement étudiées dans le cas des pyrophosphates de calcium hydratés. Plusieurs protocoles et dispositifs ont été reportés afin notamment de simuler les conditions observées *in vivo* et de synthétiser diverses phases de CPP [Pritzker *et al.*, 1978; Mandel *et al.*, 1984; Pritzker, 1998; Parekh *et al.*, 2013]. Les premières expériences en gel, dès 1978, tentent ainsi de synthétiser les phases m-CPPD et t-CPPD dans des gels de silice ou de gélatine placés dans des tubes à essai à différentes températures (10, 20 et 37°) et à pH 7,4 afin d'obtenir des cristaux de CPP dans des conditions proches de celles des articulations humaines [Pritzker *et al.*, 1978; Pritzker, 1998]. Un des objectifs de ces synthèses, en plus de mieux comprendre la formation de calcification dans l'articulation, est de former des cristaux de qualité et de taille suffisantes pour l'analyse et la résolution de la structure par diffraction des rayons X sur monocristal.

Les protocoles décrits n'ont cependant pas permis la synthèse de la phase m-CPPD observée *in vivo* et dont la structure cristallographique reste encore non résolue [Pritzker, 1998; Parekh *et al.*, 2013]. Ces travaux apportent cependant quelques éléments sur les conditions de synthèse testées. Le pH, lorsqu'il est indiqué, est fixé au niveau du pH physiologique. La densité des gels utilisés varie entre 1,02 et 1,05 g/cm^3 : la quantité de cristaux par unité de volume décroît avec la densité du gel. Les réactifs employés sont majoritairement CaCl_2 et $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, l'acétate de calcium pouvant parfois remplacer le chlorure de calcium [Mandel *et al.*, 1984]. Plusieurs phases ont été observées, dont les phases t-CPPD, m-CPPD, m-CPPT β et $\text{Ca Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [Pritzker, 1998]. Les concentrations de calcium et de pyrophosphate dans les solutions de départ pour l'obtention des cristaux de m-CPPD et t-CPPD ont été évaluées de 5 à 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pour le calcium et entre 1 et 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pour le pyrophosphate [Pritzker, 1998]. La proportion de cristaux de m-CPPD formés étant

plus importante pour des concentrations de calcium et de pyrophosphate faibles. Des phases amorphes ou de pyrophosphate de sodium et de calcium se forment à plus haute concentration en réactifs. La phase m-CPPT β est présente sur une large gamme de concentrations à la fois de calcium et de pyrophosphate dans les solutions initiales, s'étendant de 1 à 10 mmol.L⁻¹ [Brown *et al.*, 1963]. La synthèse de cristaux de m-CPPD de taille supérieure à 100 μm n'a cependant pas été reportée, cette phase étant présente sous forme pure dans seulement 1% des cas d'après les statistiques fournies par Mandel *et al.* [Mandel *et al.*, 1984].

Nous avons déjà montré que les conditions de pH et de température étaient essentielles pour la formation de cette phase (cf figure II-7 et figure IV-1) et avons mis en place un protocole de synthèse de monocristaux en phase gel.

A2 b) Protocole de synthèse par diffusion en gel

La synthèse de monocristaux de pyrophosphate de calcium décrite dans cette partie est basée sur la diffusion de réactifs dans un gel. La concentration est alors contrôlée par la diffusion des différentes espèces dans le gel, permettant d'atteindre de faibles valeurs de sursaturation locale et de favoriser ainsi la croissance des cristaux au détriment de la germination. Le but ici étant de déterminer les conditions de formation des différentes espèces de pyrophosphate de calcium étudiées.

Le gel de silice a été préféré dans cette étude au gel de collagène ou à la gélatine pour des raisons de tenue en température et à des pHs acides. Cette stabilité permettra l'étude de la formation des cristaux dans des conditions analogues à celles des études précédentes. Le précurseur de gel choisi, le métasilicate de sodium pentahydraté, Na₂SiO₃·5H₂O, présente l'avantage de ne pas libérer de composés organiques lors de la formation du gel. Ces composés pourraient en effet avoir un effet lors de la formation des cristaux. Il est de plus compatible avec l'utilisation de pyrophosphate de sodium, Na₄P₂O₇, comme réactif. Le calcium proviendra d'une solution de chlorure de calcium, CaCl₂.

La première étape consiste à la formation d'un gel de silice homogène afin de favoriser la diffusion des ions. 25 g de métasilicate de sodium pentahydraté sont dissouts dans 300 mL d'eau déionisée afin de préparer une solution de densité 1,04 g/cm³. Après complète dissolution, à pH basique proche de pH 11, la solution est additionnée sous agitation (400 tr/min) et à débit volumique constant (7,25 mL.min⁻¹) dans 15 mL d'acide acétique. L'addition est effectuée jusqu'à ce que la solution atteigne le pH souhaité. L'addition de la solution basique dans l'acide sous agitation empêche la formation d'inhomogénéité dans le gel. Le temps de prise étant plus long à pH acide, l'évolution du pH de la solution de pH acide (majorité d'acide acétique) à basique favorise la formation d'un gel

homogène. Les solutions sont ensuite laissées au repos le temps de la prise du gel qui dépend du pH choisi : 2 heures pour un pH 5,8, 8 heures pour pH 5,0, 3 jours pour pH 4,5 et 9 jours pour un pH 3,6.

Dans ce travail, nous avons démarré par des études préliminaires par diffusion de gel en tubes à essai.

A2 c) Etudes préliminaires en tube à essai

Les premières études par diffusion de gel ont été menées en tube à essai. Plusieurs conditions de pH et de température ont été testées lors d'expériences préliminaires en tube à essai sur des gels contenant un des deux réactifs (ions calcium ou pyrophosphate). Les gels sont préparés par ajout d'une solution de réactif, de pyrophosphate de sodium ou de chlorure de calcium, avant la prise du gel. Une solution, contenant le deuxième réactif, est mise en contact avec le gel (7,5 mL) après la prise de celui-ci. Les conditions de synthèse, pH 5,8, 5,0, 4,5 ou 3,6 et température 25°C ou 50°C, ont été réalisées pour des concentrations de 0,5 M et 0,25 M de chlorure de calcium et de pyrophosphate de sodium respectivement (7,5 mL), en gel ou en solution. Le système est laissé sans agitation durant 2 semaines. Les cristaux obtenus ont été analysés au microscope optique, par spectroscopie Raman et analyses EDS.

Les expériences menées avec des gels contenant des ions pyrophosphates ont abouti à la formation de cristaux majoritairement dans le gel, tandis que les gels contenant des ions calcium dans le gel ont abouti à la formation de cristaux majoritairement en surface du gel ainsi que dans la solution (figure IV-9). Ces cristaux ne se sont formés que pour les pHs les plus élevés (expériences à pH 5,8 et 5,0 à 25°C et pH 5,8 à 50°C). Les autres conditions n'ont pas conduit à la formation de cristaux. Les gels ayant été chauffés à 50°C présentent de nombreuses bulles, remplies de liquide, formées durant les deux premiers jours de l'expérience. L'origine de ces bulles n'a pas été identifiée mais pourrait provenir de l'utilisation de l'acide acétique ou du dégazage du gel à cette température.



Figure IV-9 : Cristaux synthétisés par diffusion en gel (en bas du tube). Le gel de silice contenant des ions Ca^{2+} (0,5 M) est mis en contact avec une solution de pyrophosphate de sodium (0,25 M) durant 2 semaines à 25°C et pH 5,8.

A2 d) Caractérisation des cristaux obtenus

Comme on peut le constater à l'œil nu (figure IV-9), les cristaux se présentent soit sous forme de plaquettes, dont les plus grandes sont formées en solution et peuvent atteindre 1 millimètre de longueur, soit en s'agréant sous forme de sphérulites observées dans le gel ou à l'interface. Quelques sphérulites ont été observées à l'extrémité de cristaux plus importants, pouvant indiquer une formation ultérieure de ces cristaux. Une évolution plus longue, au-delà de 2 semaines jusqu'à 1 mois, ne modifie pas l'aspect général des cristaux formés.

Les grands cristaux de forme plaquettaire ont été caractérisés dans un premier temps par microscopie optique et spectroscopie Raman (figure IV-10a). L'analyse au microscope optique a permis d'observer des plaquettes pouvant atteindre 1 mm de long, 0,4 mm de large et 10 μm d'épaisseur.

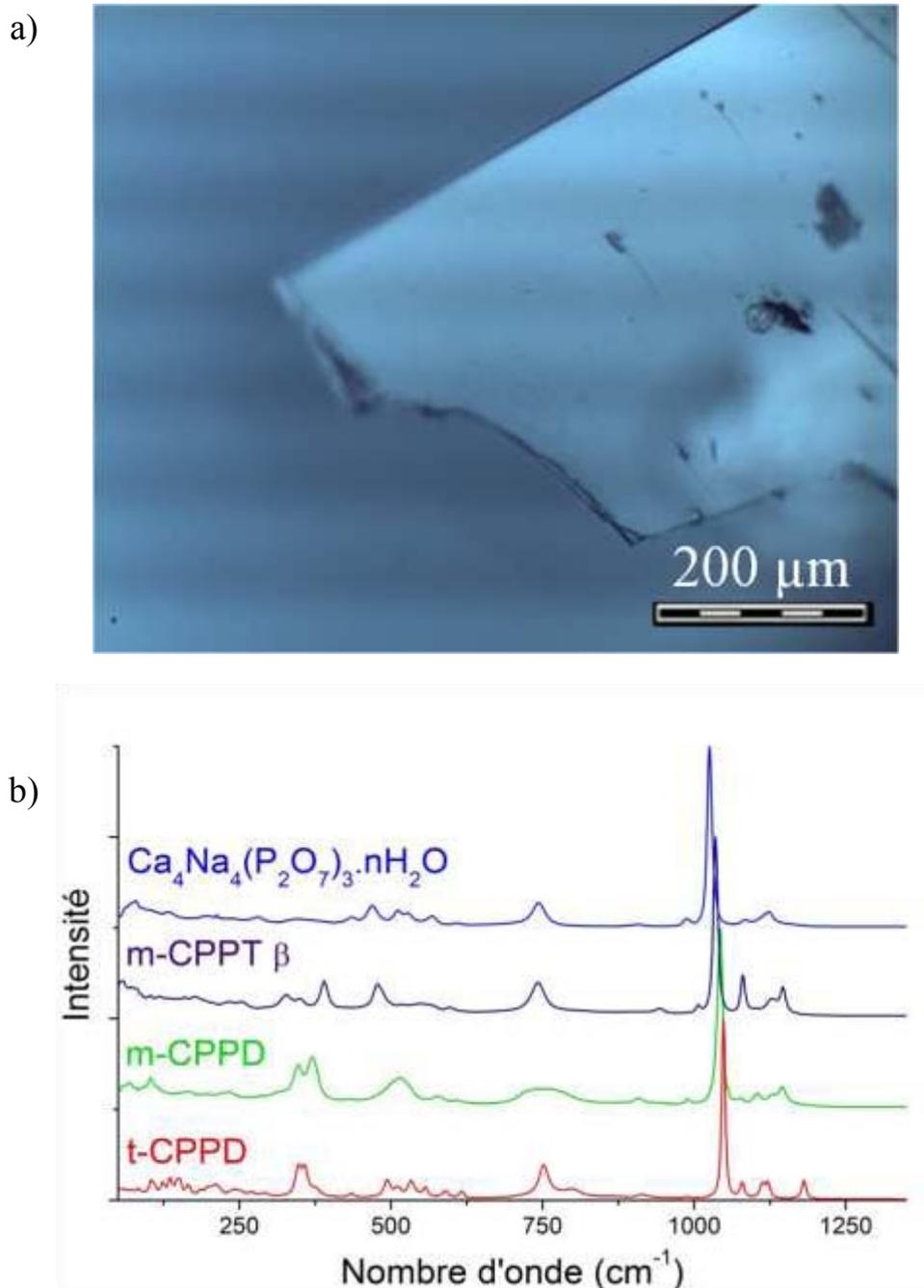


Figure IV-10 : Analyse au microscope optique (a) et spectres Raman (b) de plaquettes formées par diffusion en gel. La comparaison est faite avec les spectres des phases analysées chapitre II.

La surface est lisse et le cristal est facetté. L'analyse par spectroscopie Raman n'a pas permis d'identifier le cristal, les vibrations caractéristiques des groupements phosphates, notamment $\nu^s_{\text{PO}_3}$ aux environs de 1030 cm^{-1} , étant décalées vers les basses énergies par rapport aux phases caractérisées précédemment. La vibration caractéristique des groupements pyrophosphate, ν^s_{POP} vers 750 cm^{-1} , est visible sur le spectre confirmant la présence de la molécule dans le cristal. Aucune vibration caractéristique des molécules d'orthophosphate n'apparaît sur le spectre Raman de ce cristal. La présence de sodium en grande quantité dans la solution peut conduire à la formation de composés IV-20 |

mixtes de pyrophosphate de calcium et sodium, notamment $\text{CaNa}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, dont les structures des deux formes α et β ont été résolues. Les données Raman disponibles pour ces phases dans la littérature ne correspondent cependant pas au spectre observé [Joe *et al.*, 1991].

Des analyses élémentaires par dispersion en énergie (EDS) ont été réalisées afin d'évaluer la composition du cristal. La composition moyenne sur 8 points du cristal est estimée à $9,7 \pm 0,2$ % de calcium, $9,1 \pm 0,8$ % de sodium, $14,7 \pm 0,2$ % de phosphore et $66,5 \pm 0,7$ % d'oxygène. Cette composition est compatible avec la formule $\text{Ca}_4\text{Na}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. La quantité d'eau ne peut être estimée du fait de la vaporisation au cours de l'analyse, mais l'analyse EDS fournit une estimation d'au moins 6 molécules d'eau structurales. Cette formule, si elle s'avère correcte, n'a pas été reportée dans la littérature à notre connaissance pour des composés de pyrophosphate. Des cristaux ont été isolés afin d'effectuer l'analyse structurale du composé par diffraction des rayons X sur monocristal. Les résultats ne sont cependant pas encore disponibles.

Des observations par microscopie optique et des analyses Raman ont aussi été réalisées sur les cristaux issus des sphérulites. Les spectres Raman obtenus sur les différents cristaux indiquent que les sphérulites sont formées de cristaux de m-CPPT β (figure IV-11). Ces cristaux de dimension pouvant atteindre $500 \mu\text{m}$ de longueur et $50 \mu\text{m}$ de largeur sont adaptés à une résolution de structure par diffraction des rayons X sur monocristal. Ces cristaux ont permis la résolution de la structure de la phase m-CPPM présentée dans le chapitre II. Ils présentent un faciès de plaquette non facetté, possédant des bords courbes. Ce faciès peut être dû à une sursaturation relativement élevée des réactifs durant la croissance des cristaux. Cette sursaturation élevée provoque une transition rugueuse cinétique lorsque la taille du germe critique r^* atteint la taille de l'unité de croissance de la face favorisant l'incorporation directe des germes à la surface du cristal [Jackson, 2005]. Une dissolution partielle des cristaux pourrait aussi conduire à ce type de faciès mais la présence d'une phase plus métastable, ainsi que l'absence d'une phase thermodynamiquement plus stable, m-CPPD ou t-CPPD, ainsi que l'apparition de sphérulites pour des temps plus longs favorisent l'hypothèse d'une croissance des cristaux, au-delà de la transition rugueuse.

Une description de la transition rugueuse sera donnée afin de mieux comprendre le faciès observé et potentiellement affiner les conditions de synthèse afin d'obtenir des cristaux de qualité suffisante pour la diffraction des rayons X sur monocristal, et notamment des cristaux de m-CPPD.

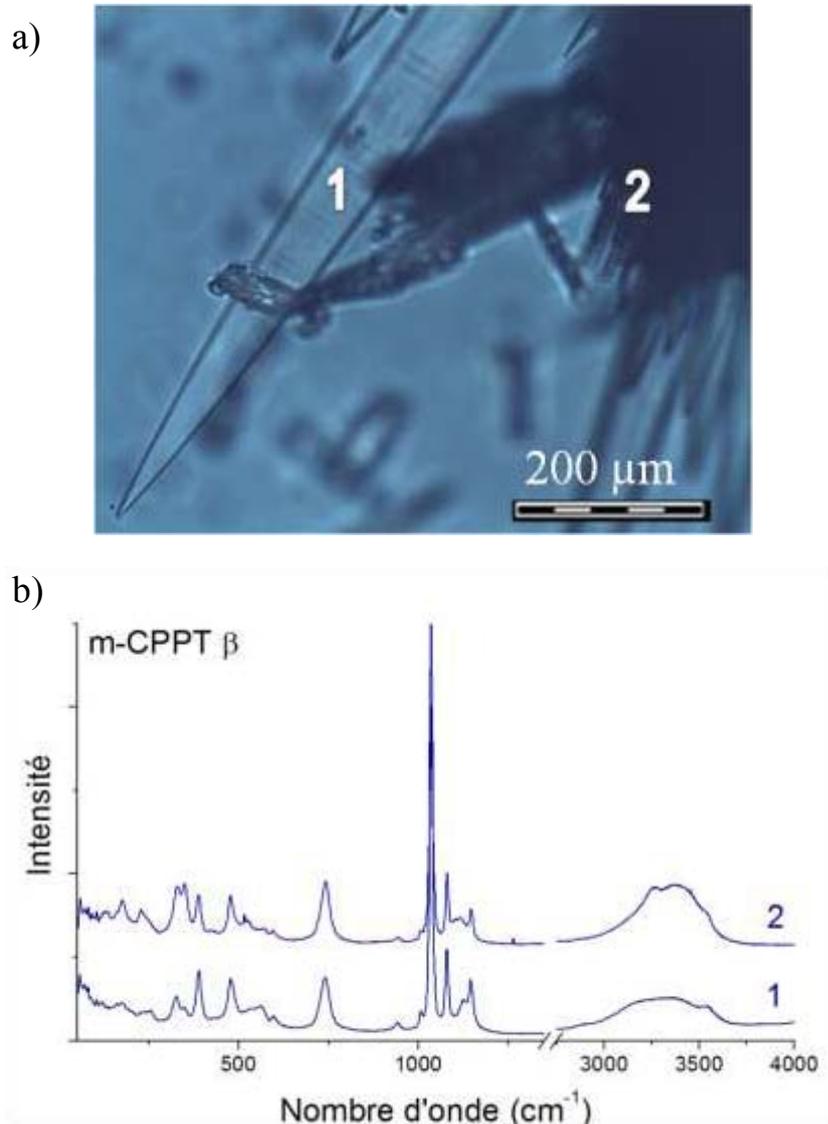


Figure IV-11 : Observation au microscope optique (a) et spectres Raman (b) de sphérulites formées par diffusion en gel. Les effets de polarisation peuvent être observés entre les spectres 1 et 2.

Les processus de cristallisation sont représentés par un modèle d'intégration d'une unité de croissance (ions, molécules, atomes, ...) à la surface du cristal [Jackson, 2005]. Dans la majorité des cas, après adsorption de l'unité de croissance et perte partielle de la couche de solvation, l'unité de croissance diffuse dans la couche d'adsorption jusqu'à un site d'intégration favorable ou retourne en solution. L'analyse énergétique de ce processus montre que les marches et les nœuds, présentant plus de surface de contact avec l'unité de croissance, sont plus favorables à son intégration. Le facteur d'entropie de Jackson α , donné dans l'équation (IV-1), peut être utilisé pour estimer la concentration de nœuds sur une surface donnée en fonction de la différence d'énergie de liaison du système [Jackson, 2005]:

$$\alpha_i = \frac{4\Phi_i}{k_B T} \quad (\text{IV-1})$$

où α_i représente le facteur d'entropie de Jackson de la face i , T la température et Φ_i l'énergie de liaison soit la somme des contributions entre phases solide et liquide sur cette même face. Φ_i peut être écrit (équation (IV-2)) par décomposition entre les énergies potentielles d'interaction solide-solide Φ_i^{ss} , solide-fluide Φ_i^{sf} et fluide-fluide Φ^{ff} :

$$\Phi_i = -\Phi_i^{sf} + \frac{1}{2}(\Phi_i^{ss} + \Phi^{ff}) \quad (IV-2)$$

La force motrice de la cristallisation, β'_i proportionnelle à la sursaturation pour des valeurs faibles, peut de même être reliée par l'équation (IV-3) à la différence de potentiel chimique entre une unité de fluide, de potentiel μ^f , et une unité de solide, de potentiel μ_i^s :

$$\beta_i = \frac{\Delta\mu}{k_B T} = \frac{\mu^f - \mu_i^s}{k_B T} \quad (IV-3)$$

Le facteur d'entropie peut aussi être relié via l'équation (IV-4) à la tension interfaciale solide-fluide σ_i^{sf} s'appliquant sur une unité de surface correspondant à la distance entre plans réticulaires d .

$$\alpha_i = \frac{4d^2\sigma_i^{sf}}{k_B T} \quad (IV-4)$$

Cette relation est strictement vraie pour une maille cubique mais peut être utilisée comme approximation dans le cas général.

Trois régimes peuvent être déduits de la valeur de α :

- a) Si $\alpha_i < 3,2$, la surface est rugueuse au niveau moléculaire et l'unité de croissance est immédiatement intégrée lors de son approche de la surface.
- b) Si $3,2 < \alpha_i < 4$, le cristal a une surface lisse mais la germination est encore possible à faible sursaturation
- c) Si $\alpha_i > 4$, la surface est lisse à l'échelle atomique et la croissance ne pourra se faire qu'au niveau des marches.

Quand $\alpha_i \approx 3,2 = \alpha_i^R$ il existe donc une transition rugueuse pour laquelle on définit une

température adimensionnelle θ_i^R , où l'indice R indique la transition, telle que (équation (IV-5)) :

$$\theta_i^R = \left| \frac{2k_b T^R}{\Phi_i^R} \right| \quad (IV-5)$$

Si $\theta < \theta_i^R$ alors $\sigma_i^{sf} > 0$, la face est lisse et la face va croître suivant un mécanisme de germination bidimensionnelle.

Si $\theta \geq \theta_i^R$ alors $\sigma_i^{sf} = 0$, la face est rugueuse et le cristal grossit sans barrière d'énergie, donnant lieu à des positionnements statistiques des sites d'adhésion, sans orientation cristallographique, et donc à une perte du faciès du cristal.

Pour chacune des faces du cristal, il apparaît une séquence d'Ising, ou de températures critiques pour lesquelles la transition rugueuse sera observée. Le même raisonnement peut être appliqué à une sursaturation critique reliée à β_i^R de telle sorte que :

$$\beta_N^R > \beta_{N-1}^R > \dots > \beta_2^R > \beta_1^R$$

Ainsi lorsque la sursaturation augmente, les transitions rugueuses vont avoir lieu pour les surfaces avec les plus grandes énergies et donc les faces les moins développées du cristal. Nous observons dans les figures IV-11 et IV-12, en reliant le faciès à la morphologie générale des cristaux de m-CPPT β établie par Balić-Žunić *et al.*, que les faces {001} et {011} ont dépassé leur transition rugueuse sans que la face {100}, supposément beaucoup moins énergétique de par sa structure principalement constituée de molécule d'eau, ne soit affectée [Balić-Žunić *et al.*, 2000].



Figure IV-12 : Evolution de la morphologie de cristaux de m-CPPT β au-delà de la transition rugueuse des faces {001} et {011}

Une diminution de la sursaturation pourrait ainsi conduire à la formation de cristaux de bonne qualité cristallographique, tout en favorisant la formation des phases dihydratés t-CPPD et m-CPPD.

A2 e) Expériences en cellule de diffusion

Le protocole a été adapté pour son utilisation en cellule de diffusion afin de ralentir encore la diffusion des réactifs (figure IV-13). Les solutions de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ont été préparées sans ajout de

réactif avec une densité de $1,04 \text{ g/cm}^3$ d'après le protocole décrit dans la partie Chapitre IVA2 b). La solution est ensuite coulée dans le compartiment central d'une cellule de diffusion comprenant 3 compartiments de même volume (150 mL) délimités par une membrane de dialyse (Cellu Step T3, MWCO 12000-14000) : le compartiment central contient le gel et les deux compartiments latéraux contiennent respectivement la solution de calcium et la solution de pyrophosphate. La membrane est choisie pour sa non-sélectivité aux ions présents et sa très bonne tenue aux pH acides. La solution est laissée au repos lors de la prise du gel. L'étanchéité de la cellule est assurée par un joint silicone, la jonction étant recouverte de parafilm. La cohésion de la cellule est assurée des broches en métal (Figure IV-13).



Figure IV-13 : Cellule de diffusion avec gel de silice dans le compartiment central.

Suite aux expériences préliminaires en tube à essai, les conditions d'utilisation de la cellule de diffusion ont été fixées à pH 5,8 et de température 25°C . L'utilisation d'une cellule comprenant trois compartiments, au lieu d'un gel contenant un des réactifs, permet une mise en contact plus lente des réactifs. Ainsi les sursaturations atteintes à proximité des germes, puis des cristaux, seront plus faibles, en vue de favoriser la croissance de cristaux de dimension adaptée à la résolution de structure sur monocristal. En tenant compte du fait que la diffusion en gel permet l'utilisation de quantités importantes de réactifs et que la sursaturation locale dépend également des facteurs physiques du gel notamment de sa densité, plusieurs concentrations ont été testées.

Les solutions de réactifs ont été préparées séparément en dissolvant une certaine quantité de CaCl_2 ou de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ dans 250 mL de solution tampon acide acétique/ammoniaque pour fixer le pH. Les solutions de réactifs utilisées ont été préparées successivement à 500 mmol.L^{-1} de CaCl_2 et 250

mmol.L⁻¹ de Na₄P₂O₇ dans une première expérience, puis 50 mmol.L⁻¹ de CaCl₂ et 25 mmol.L⁻¹ de Na₄P₂O₇, et enfin 6 mmol.L⁻¹ de CaCl₂ et 3 mmol.L⁻¹ de Na₄P₂O₇, chacune des solutions étant tamponnée à pH 5,8. Elles ont ensuite été versées dans les compartiments latéraux puis le système a été laissé à évoluer pendant trois mois pour chacune des conditions testées. Les pH mesurés à la fin de l'expérience ne montrent pas de variation notable ($\Delta\text{pH} < 0,2$).

Les expériences à concentration égales à 500 mmol.L⁻¹ en CaCl₂ et 250 mmol.L⁻¹ en Na₄P₂O₇, et 50 mmol.L⁻¹ en CaCl₂ et 25 mmol.L⁻¹ en Na₄P₂O₇ montrent l'apparition de trois zones dans le gel (figure IV-14). Une zone de gel opaque apparaît dans la moitié du gel au contact du compartiment contenant initialement la solution de calcium. Une zone blanche fine apparaît approximativement au centre de la cellule, décalée de 5 mm par rapport à celui-ci, vers le compartiment contenant la solution de pyrophosphate. Cette démarcation pourrait indiquer la zone de rencontre initiale des réactifs après diffusion dans le gel. La présence de celle-ci au centre de la cellule pourrait donc indiquer une vitesse de diffusion dans le gel similaire pour les ions calcium et pyrophosphate. L'effet de la taille de l'ion pyrophosphate en solution [Hong *et al.*, 2012] comparée à la taille l'ion calcium avec sa sphère d'hydratation [Pavlov *et al.*, 1998] pourrait en partie être compensé par la différence d'interaction physico-chimique entre l'ion Ca²⁺ et la matrice Si-O d'une part et de l'ion hydrogénopyrophosphate H₂P₂O₇²⁻ avec cette même matrice. Les concentrations des différents ions, calcium et pyrophosphate, dans le gel n'ont pas pu être mesurées pour confirmer l'évolution de la concentration dans la cellule. Une troisième zone, au contact avec le compartiment contenant la solution de pyrophosphate, est constituée de gel translucide. Des agglomérats sont présents dans le compartiment contenant initialement la solution de pyrophosphate. Aucune modification du gel ne fut visible lors de la troisième expérience aux plus basses concentrations, et aucun cristal ou précipité n'a été détecté.

Chacune des zones du gel a été analysée par microscopie optique et spectroscopie Raman. L'analyse Raman révèle que les zones opaques sont constituées de composés de pyrophosphate amorphes, la densité de ces précipités étant plus grande dans la zone centrale. L'observation par microscopie optique ne révèle aucun cristal de taille micrométrique dans ces zones bien que certains précipités rassemblent des agglomérats de taille millimétrique. La partie translucide contient des agglomérats de cristaux de taille variable, prenant la forme d'aiguilles pour la concentration la plus élevée (500 mmol.L⁻¹ en Ca²⁺) ou de plaquettes pour la concentration intermédiaire (50 mmol.L⁻¹ en Ca²⁺).

L'excès de calcium pourrait donc conduire à l'inhibition de la cristallisation. Cette observation est compatible avec les expériences menées en solution, pour lesquelles l'ajout d'une solution de calcium dans une solution de pyrophosphate tamponnée conduit à la formation d'une phase cristallisée

tandis que l'ajout direct de la solution pyrophosphate dans une solution de calcium tamponnée conduit à la formation d'une phase amorphe.

a)



b)



Figure IV-14 : Cellule de diffusion après diffusion des réactifs pendant trois mois : Ca^{2+} dans le compartiment de gauche, $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ dans le compartiment de droite. Concentration a) 500 mmol.L^{-1} et b) 50 mmol.L^{-1} en CaCl_2

L'analyse par spectroscopie Raman des différents cristaux révèle que les cristaux en forme d'aiguilles sont constitués de la phase $\text{Ca}_4\text{Na}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ identifiée précédemment tandis que les cristaux obtenus pour la concentration intermédiaire sont constitués de m-CPPT β (figures IV-15 et IV-16). Les formes obtenues diffèrent de celles observées lors des tests préliminaires : le composé

$\text{Ca}_4\text{Na}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ est présent dans cette expérience sous forme d'aiguilles et non plus de plaquettes. Les aiguilles sont cependant de très mauvaise qualité cristallographique, présentant de nombreuses macles. Les cristaux de m-CPPT β présentent toujours un faciès arrondi, mais certains cristaux parmi les plus grands n'ont que la famille cristallographique (011) qui apparaît modifiée. La diffusion et la croissance en gel, en diminuant la sursaturation locale, pourraient expliquer ces changements.

La forme des agglomérats obtenus est aussi modifiée dans les deux cas et coïncide avec une formation par croissance dans une direction privilégiée à partir d'un germe central. La croissance est alors réalisée perpendiculairement au flux dans la cellule de diffusion, que se soit pour les aiguilles sous forme de cônes ou les plaquettes en amas circulaires, conduisant à des agglomérats possédant un axe de rotation lui aussi perpendiculaire à l'axe de la cellule (Figure IV-14). La direction de diffusion est sans doute à l'origine de ces orientations.

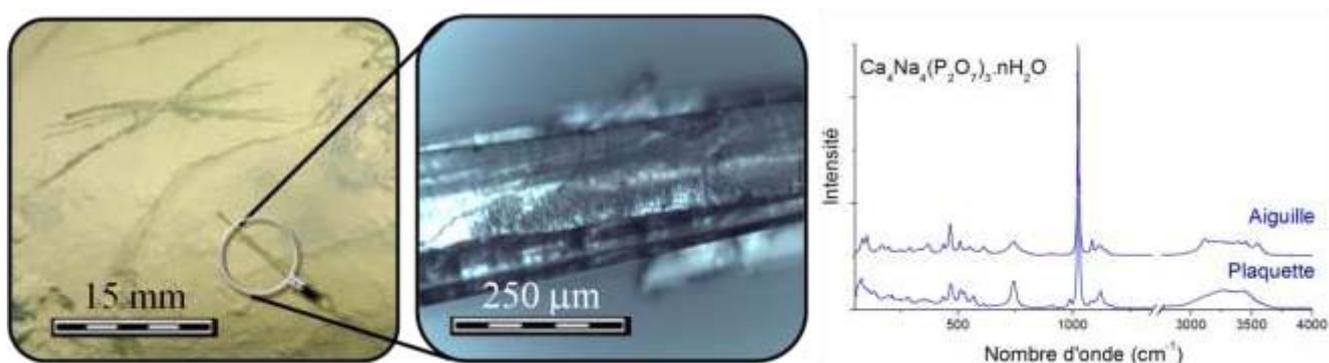


Figure IV-15 : Observations au microscope optique et spectre Raman des cristaux obtenus à pH 5,8 et 50°C pour des concentrations de 500 mmol.L⁻¹ [Ca²⁺] et 250 mmol.L⁻¹ [P₂O₇⁴⁻]

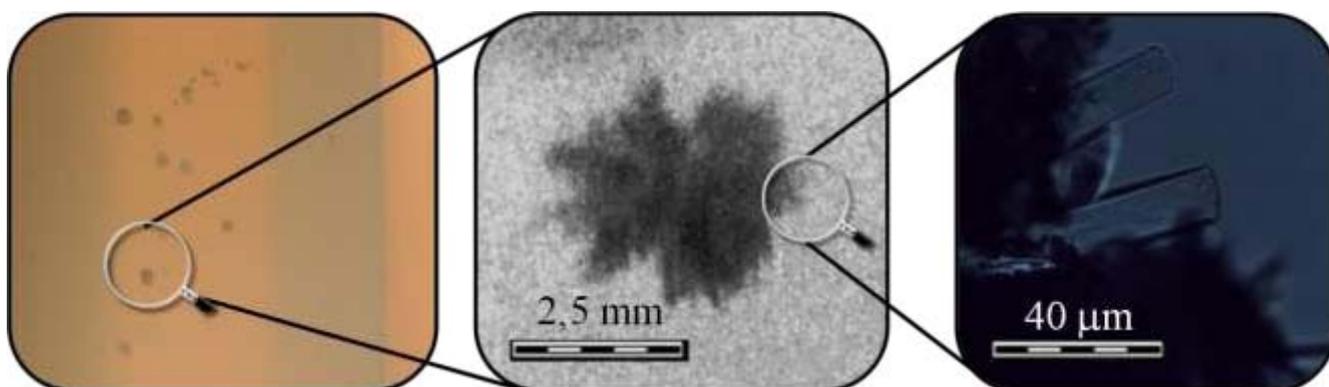


Figure IV-16 : Observations au microscope optique et spectre Raman des cristaux obtenus à pH 5,8 et 50°C pour des concentrations de 50 mmol.L⁻¹ [Ca²⁺] et 25 mmol.L⁻¹ [P₂O₇⁴⁻]

Les résultats des trois expériences en cellule de diffusion n'ont pas permis la synthèse de monocristaux de la phase m-CPPD exploitables pour l'analyse DRX sur monocristal. Les conditions utilisées n'ont pas conduit à la formation de cette phase. D'autres conditions, notamment en IV-28 |

température, devront être testées afin de produire à terme les cristaux de la phase m-CPPD. Les expériences ont cependant montré l'utilité d'une telle méthode de synthèse dans le cas des cristaux de pyrophosphate de calcium. Une nouvelle phase a pu être partiellement décrite et des cristaux de taille supérieure à 100 μm ont été produits pour cette phase ainsi que pour la phase m-CPPT β .

A3. Synthèse en réacteur parfaitement agité

A l'inverse de la synthèse en gel, afin d'étudier le rôle de l'agitation dans la synthèse de CPP, le protocole décrit dans le chapitre II a été adapté à la synthèse de CPP en réacteur parfaitement agité. Ce travail a été réalisé en collaboration avec B. Biscans et S. Teychené du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse. La précipitation a été réalisée dans un réacteur double-parois en Pyrex d'un litre équipé d'un couvercle, de quatre contre-pales, d'un réfrigérant et d'un thermomètre Pt-100 (figure IV-17). La température a été contrôlée dans l'enceinte par un bain thermostaté programmable, le montage ne permettant pas de dépasser 60°C. L'agitation a été effectuée par un arbre d'agitation réglée à 400 tr/min pour toutes les expériences. L'addition des réactifs a été réalisée au moyen d'une pompe péristaltique (Minipuls 3, Gilson Inc) munie de deux tuyaux Tygon de diamètre 2,79 mm pour un débit de 4,5 mL.min⁻¹.

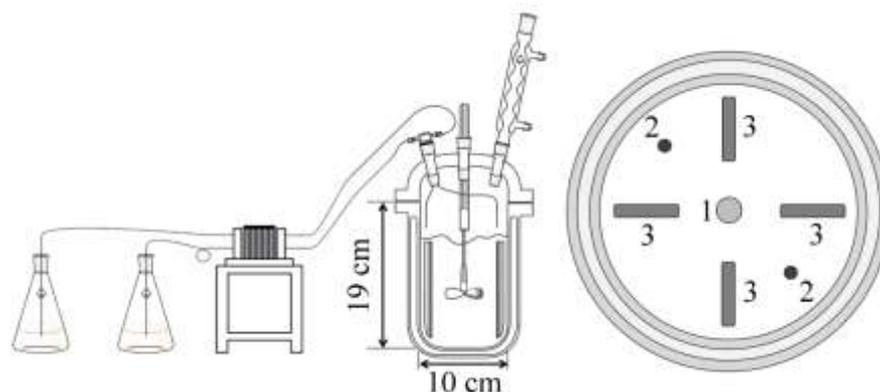


Figure IV-17 : Schéma du réacteur utilisé pour la synthèse de CPP en réacteur parfaitement agité. Positions de l'agitateur mécanique (1), des alimentations en réactifs (2) et des contre-pales (3) en vue du dessus.

L'influence du pH et de la température ont été étudiées en variant le pH de la solution tampon dans une gamme comprise entre pH 3,6 et pH 7,4 et la température entre 25°C et 60°C. Les échantillons ont été analysés par spectroscopie FTIR et DRX sur poudre et analyses thermiques et analyses micrographiques puis comparé aux données publiées [Brown *et al.*, 1963; Davis *et al.*, 1985; Mandel *et al.*, 1988; Balić-Žunić *et al.*, 2000; Slater *et al.*, 2011]. Les conditions correspondant aux domaines de formation des phases pures de CPP hydratés tels qu'obtenus par cette méthode de synthèse sont présentées dans le diagramme de la figure IV-18.

Pour une concentration totale donnée d'ions pyrophosphate et calcium, respectivement 75 mmol.L^{-1} et 150 mmol.L^{-1} dans les solutions de réactifs, deux domaines ont été identifiés par DRX et spectroscopie FTIR dans ce système, correspondant à deux phases de pyrophosphate de calcium hydraté : la phase a-CPP, une phase amorphe se forme pour des pHs supérieurs à pH 5,0 et une phase dénommée u-CPP (« undefined »), qui n'a pu être identifiée précisément sur la base de ces diagrammes DRX et spectres FTIR, se forme à des pH inférieurs à pH 4,5. Le domaine de formation de la phase u-CPP correspond au domaine de synthèse de la phase m-CPPT β dans l'expérience décrite au chapitre II (Figure II-7). Elle est cependant déplacée vers les pHs plus acides, la frontière entre phase cristallisée et phase amorphe étant située aux environs de pH 5,5 selon le procédé décrit au chapitre II. Les premiers signes de précipitation (blanchiment de la solution) sont observés pour des temps sensiblement plus longs (de 15 à 35 min) que dans l'expérience standard (de 3 à 10 min, cf. chapitre II).

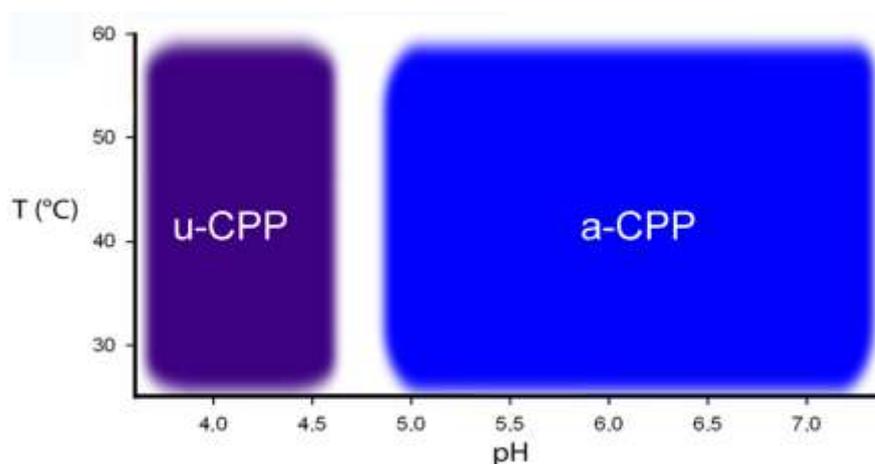


Figure IV-18 : Conditions de synthèse en réacteur parfaitement agité de deux phases de CPP hydraté pures. Des mélanges de phases sont obtenus pour les conditions à l'extérieur de ces domaines

A3 a) Analyse DRX

Le diagramme DRX obtenu est similaire à celui de la phase dihydratée h-CPPD décrite par Mandel *et al.* mais les indications fournies ne permettent pas d'indexer l'intégralité du diagramme présenté sur la figure IV-19 [Mandel *et al.*, 1988]. La phase h-CPPD est obtenue par déshydratation sous vide de la phase m-CPPT β .

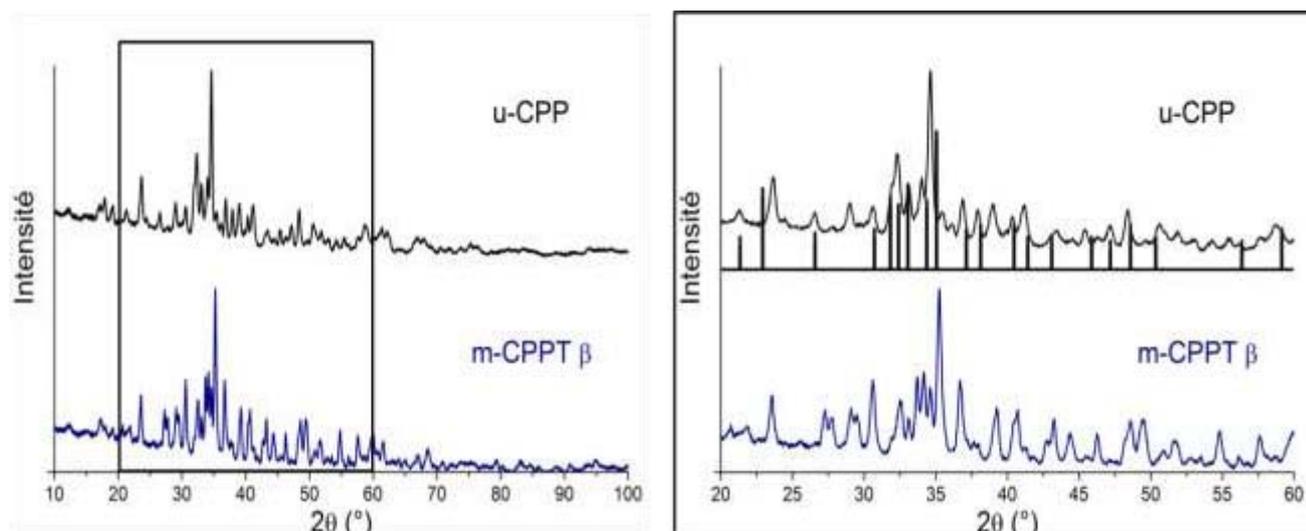


Figure IV-19 : Diagrammes de diffraction des rayons X (K_{α} Co) des phases u-CPP et m-CPPT β . Les barres sous le diagramme de u-CPP correspondent aux intensités décrites par Mandel *et al.* pour h-CPPD. [Mandel *et al.*, 1988]

Les paramètres de mailles de u-CPP ont été déterminés par analyse Rietveld (Tableau IV-1). La maille, monoclinique, semble plus compacte que celle de m-CPPT β , avec une diminution de 7% du paramètre a. Cette contraction particulière de la maille correspondrait à une perte de la structure en couche de m-CPPT β , avec une dégradation du réseau de molécule d'eau. La structure de u-CPP n'a cependant pas été résolue.

Tableau IV-1 : Paramètres de maille obtenus pour les phases m-CPPT β et u-CPP comparés aux données publiées par Balić-Žunić *et al.* [Balić-Žunić *et al.*, 2000]. Les écart-types estimés sont indiqués entre parenthèses.

	Réf.	Rp/ Rwp	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
m-CPPT β	affiné	0,0614/0,0789	12,288(1)	7,512(1)	10,776(1)	90,00	112,51(1)	90,00
	[Balić-Žunić <i>et al.</i> , 2000]		12,287(6)	7,511(3)	10,775(5)	90,00	112,54(1)	90,00
u-CPP	affiné	0,0448/0,0589	11,416(3)	7,418(1)	10,875(3)	90,00	110,17(2)	90,00

A3 b) Analyse FTIR

La similarité entre les spectres FTIR de la phase u-CPP et m-CPPT β visible sur la figure II-3 indique des analogies d'environnements de la molécule de pyrophosphate dans les deux phases. Des différences plus marquées sont visibles dans le domaine entre 3750 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} , indiquant des changements dans l'environnement des molécules d'eau. Le spectre de la phase h-CPPD n'étant pas publié, aucune comparaison n'a pu être faite avec cette phase.

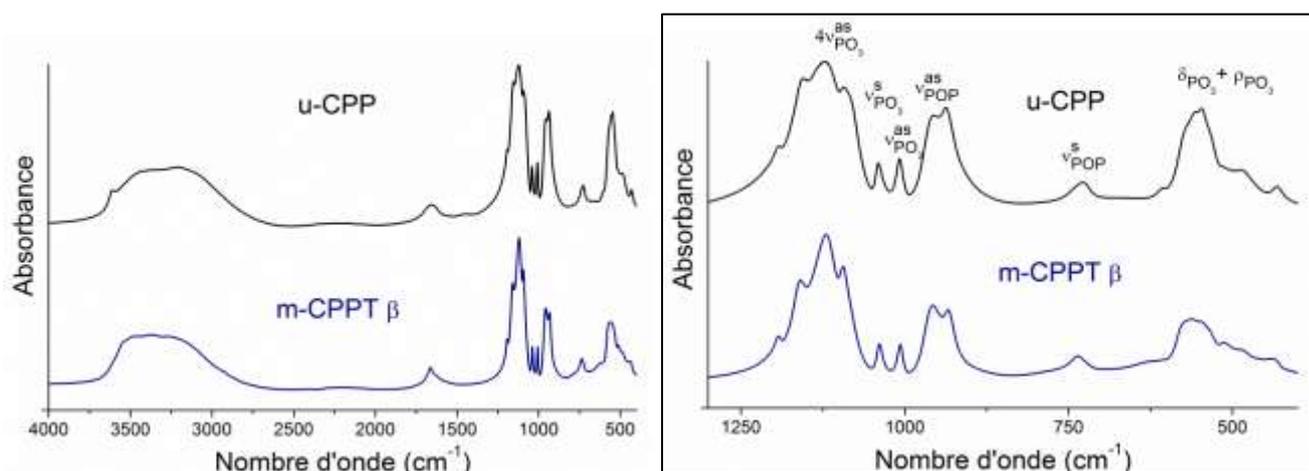


Figure IV-20 : Spectres FTIR des phases de CPPu-CPP et m-CPPT β synthétisées : domaines a) 4000–400 cm^{-1} et b) 1300–500 cm^{-1} .

Ces observations pourraient indiquer une relation étroite entre les deux phases, les différences pouvant être reliées à l'hydratation de ces phases.

A3 c) Analyses thermiques

Les analyses thermogravimétriques (ATG) et thermiques différentielles (ATD), présentées respectivement sur les figures IV-21 et IV-22, révèlent encore de fortes similitudes entre les phases m-CPPT β et u-CPP. Les pertes de masse à des températures supérieures à 30°C sont identiques en quantité, environ 3 molécules d'eau, et dans leur cinétique, avec 2 phases de déshydratation successives.

Les différences entre ces phases proviennent de la température de déshydratation et des réactions observées. La phase u-CPP ne possède pas de perte de masse lors du palier de stabilisation à 30°C et la deuxième perte de masse, aux environs de 260°C, a lieu 80°C avant celle de la phase m-CPPT β . Cette différence est aussi observable sur les diagrammes ATD où le pic exothermique de m-CPPT β , associé à l'hydrolyse de la molécule de pyrophosphate à 250°C, est remplacé par un pic endothermique pour u-CPP, correspondant à la perte d'eau.

La perte d'eau totale au cours de l'analyse est de 3,73 H_2O pour m-CPPT β et 2,83 H_2O pour u-CPP. Ces analyses indiquent que la phase u-CPP est un pyrophosphate de calcium trihydraté, proche de m-CPPT β . Cette phase, synthétisée en réacteur parfaitement agité, n'a cependant pas le même processus de déshydratation que la phase m-CPPT β puisqu'il ne semble pas faire intervenir d'hydrolyse de la molécule de pyrophosphate peut être en raison de la température inférieure de départ de la molécule d'eau impliquée dans cette réaction liée à des modifications structurales.

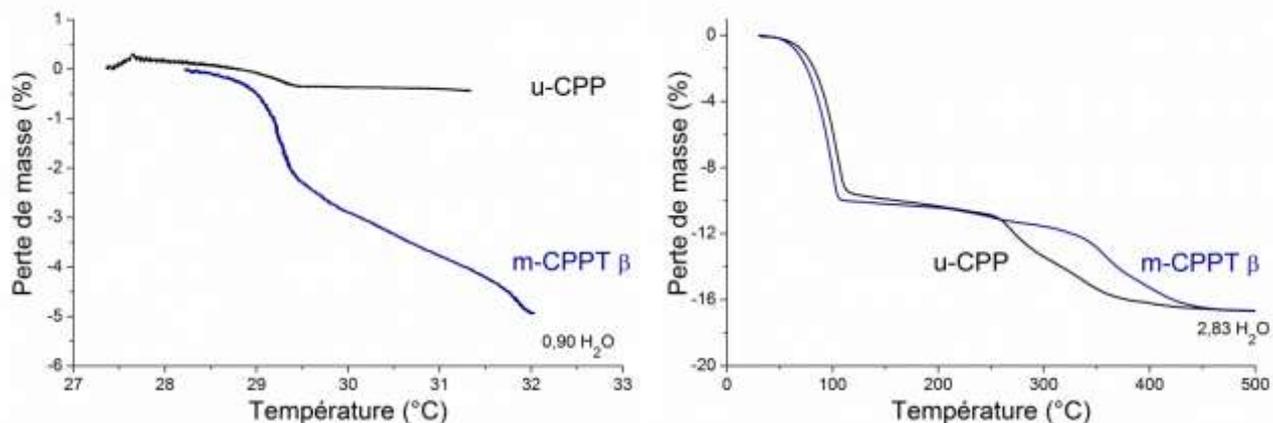


Figure IV-21 : Thermogrammes ATG des phases u-CPP et m-CPPT β jusqu'à 500°C.

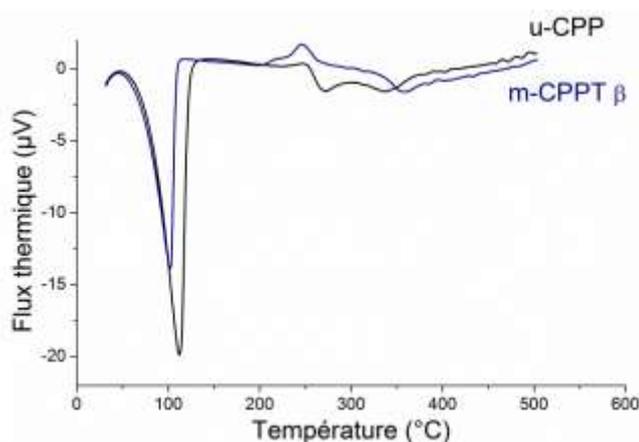


Figure IV-22 : Thermogrammes ATD des phases u-CPP et m-CPPT β.

A3 d) Analyse micrographique MEB

La figure IV-23 montre le faciès plaquettaire des cristaux de u-CPP, agglomérés sous forme de roses des sables. Cette forme est proche morphologiquement de celle observée dans les premiers stades d'évolution de la phase amorphe, notamment au premier jour qui est attribuée à m-CPPT β sur la base des analyses par spectroscopie FTIR et DRX. Les premiers stades d'évolution de la phase amorphe pourraient ainsi potentiellement faire intervenir la phase u-CPP, conjointement à m-CPPT β. Nos données, notamment de DRX n'ont cependant pas permis de détecter cette phase à ce stade. Cette étude pourrait indiquer que la phase u-CPP serait un précurseur possible de la phase m-CPPT β, comme intermédiaire avec la phase a-CPP. Les cristaux sont plus petits, jusqu'à 4 μm, et plus fins que ceux de m-CPPT β.

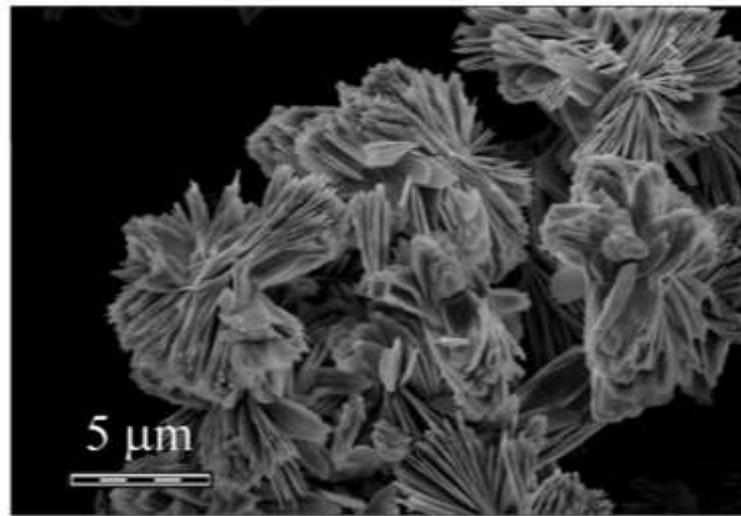


Figure IV-23 : Micrographie MEB de la phase u-CPP.

La phase u-CPP a donc été identifiée comme une phase trihydratée de pyrophosphate de calcium pouvant être un précurseur de la phase m-CPPT β . La formation et les propriétés du composé u-CPP synthétisé en réacteur ne sont cependant pas encore comprises. La formation de cette phase pourrait être due aux conditions hydrodynamiques particulières dans le réacteur, notamment à une sursaturation beaucoup plus élevée au moment de la cristallisation qui implique une vitesse de nucléation et de croissance cristalline plus grande. Une contamination par les différents éléments du réacteur, notamment en fer, n'est cependant pas à exclure.

B. Evolution de CPP en température : Etude de la déshydratation et des changements de phase

Cette partie portera sur les évolutions des différentes phases en température. Les déshydratations successives et les transitions de phases associées seront particulièrement étudiées afin de définir le comportement des pyrophosphates de calcium à haute température.

B1. Etat de l'art

Bien que les évolutions des orthophosphates de calcium en température soient bien décrites dans la littérature, peu de données sont disponibles sur les pyrophosphates de calcium hydratés [Dosen & Giese, 2011; Slater *et al.*, 2011]. Ces données paraissent pourtant importantes pour la compréhension de différents mécanismes pouvant avoir lieu à haute température, dont l'hydrolyse des polyphosphates [Christoffersen *et al.*, 2000; Slater *et al.*, 2011]. Elle pourraient de plus clarifier les modes de formation et d'évolution de verres de phosphates.

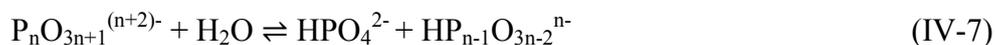
Les différentes phases de CPP possèdent différents états d'hydratation. Ces phases sont liées entre elles par des relations de stabilité déjà décrites dans le chapitre I (figure I-8). Les évolutions de ces phases hydratées en température, du composé initial jusqu'au pyrophosphate de calcium anhydre α -Ca₂P₂O₇, sont cependant mal décrites contrairement aux évolutions des phases anhydres de pyrophosphate de calcium, en lien avec les évolutions des orthophosphates de calcium.

Les phases anhydres obtenues à hautes températures γ -Ca₂P₂O₇, β -Ca₂P₂O₇ et α -Ca₂P₂O₇ ont été décrites comme se formant à partir de monétite CaHPO₄ à des températures de 450°C, 750°C et 1140°C respectivement [Webb, 1966; Calvo, 1968]. A 1353°C, le pyrophosphate de calcium anhydre se décompose en métaphosphate et chaux vive d'après l'équation (IV-6) :



L'évolution des phases hydratées est décrite succinctement dans la littérature dans le cas de la phase tétrahydratée m-CPPT β et de la phase amorphe a-CPP [Christoffersen *et al.*, 2000; Slater *et al.*, 2011]. Dans le premier cas, l'analyse thermique montre une perte d'une molécule d'eau à une température inférieure à 80°C, puis une perte de deux molécules d'eau entre 80 et 140°C et enfin la perte de la dernière molécule d'eau entre 300°C et 500°C. Les différentes transitions de phases ne sont pas abordées. Dans le cas de l'amorphe, la perte d'eau est continue de 50°C à 500°C avec une perte importante (~84% de la quantité totale) en deçà de 200°C. La quantité totale d'eau est donnée en terme d'équivalent dans la formule Ca₂P₂O₇·nH₂O avec 3,8 < n < 4,2.

Un événement particulier a aussi été mis en évidence dans le cas de l'amorphe de pyrophosphate de calcium (a-CPP) mais aussi des amorphes de polyphosphate de calcium en général lors de leur chauffage [Sinyaev *et al.*, 2001; Slater *et al.*, 2011]. On observe en effet pour des températures proches de 140°C une hydrolyse des polyphosphates, déjà présentée dans le chapitre II, suivant une variante de l'équation (II-5) :



Cette hydrolyse dite interne, ne s'effectuant pas en solution, a été observée dans la phase amorphe a-CPP lorsque des molécules d'eau contenues dans la phase réagissent avec les molécules de pyrophosphates environnantes pour former de faibles quantités d'ions orthophosphate ou hydrogénopolyphosphate [Slater *et al.*, 2011]. A notre connaissance, un phénomène similaire n'a cependant pas été décrit pour les phases cristallines de pyrophosphate de calcium.

A plus haute température, la molécule de polyphosphate se reforme dans des proportions et des longueurs de chaîne proche de celles de l'échantillon initial, formant dans le cas des pyrophosphates un composé cristallisé β -Ca₂P₂O₇. Les évolutions à des températures supérieures à 700°C sont identiques à celles découlant de l'évolution thermique de la monétite CaHPO₄.

Dans cette partie, les différents échantillons des phases analysées ont été synthétisés par la méthode présentée dans le chapitre II sauf si mention contraire.

B2. Caractérisations des phases hydratées de CPP à hautes températures

Les thermogrammes obtenus par analyse thermogravimétrique (ATG) et analyse thermodifférentielle (ATD) des phases m-CPPT β , m-CPPD, t-CPPD et a-CPP révèlent plusieurs événements lors de traitements en température. Ces événements sont soit endothermiques, soit exothermiques, révélant plusieurs étapes intermédiaires dans le processus de déshydratation. Dans ce contexte, les évolutions des phases m-CPPT β , m-CPPD, t-CPPD et a-CPP ont été étudiées en utilisant plusieurs techniques de caractérisation complémentaires (ATG/ATD, DRX et spectroscopie FTIR) afin de décrire et préciser les différents mécanismes de déshydratation et d'identifier les différentes étapes du processus.

B2 a) Analyse thermiques des CPP par ATG/ATD

Les analyses thermogravimétriques et thermodifférentielles des divers CPP synthétisés dans cette étude ont été partiellement présentées dans le chapitre II (figure II-5). Les pertes de masse ont été décrites comme s'effectuant en trois étapes pour les composés dihydratés m-CPPD et t-CPPD, et en quatre étapes pour m-CPPT β .

Les pertes d'eau des deux composés dihydratés s'effectuent suivant le même schéma avec trois pertes de masse successives correspondant aux trois pics endothermiques observés en ATD. Les pertes en différentes étapes sont récapitulées dans le tableau IV-2.

Tableau IV-2 : Pertes de masse partielles des phases de CPPD exprimées en nombre de molécules d'eau en fonction de la température de traitement, calculées à partir des thermogrammes ATG

H ₂ O par Ca ₂ P ₂ O ₇	t-CPPD	m-CPPD
$\leq 30^{\circ}\text{C}$	0	0
$30^{\circ}\text{C}-225^{\circ}\text{C}$	0,14	0,41
$225^{\circ}\text{C}-275^{\circ}\text{C}$	0,31	0,69
$275^{\circ}\text{C}-500^{\circ}\text{C}$	1,67	1,04
Total	2,12	2,14

Les deux derniers pics endothermiques peuvent de plus être décomposés en deux pics pour chacune des phases correspondant soit à deux pics endothermiques soit à la superposition d'un pic endothermique important avec un pic exothermique.

Les pertes d'eau du composé tétrahydraté s'effectuent en quatre étapes, dont une ayant lieu à des températures inférieures à 30°C non visible sur la figure II-5, correspondant à deux pics endothermiques et deux pics exothermiques observés en ATD. Les pertes en différentes étapes sont récapitulées dans le tableau IV-3.

Tableau IV-3 : Pertes de masse partielles de la phase m-CPPT β exprimées en nombre de molécules d'eau en fonction de la température de traitement, calculées à partir des thermogrammes ATG

H ₂ O par Ca ₂ P ₂ O ₇	m-CPPT β
$\leq 30^{\circ}\text{C}$	0,90
30°C-200°C	1,92
200°C-300°C	0,19
300°C-500°C	0,72
Total	3,73

La phase amorphe présente une perte d'eau continue de 30°C jusqu'à 500°C pour une perte totale de 3,87 molécules d'eau, dont 0,30 molécules d'eau avant 30°C et 2,44 molécules d'eau jusqu'à 200°C (tableau IV-4). Dans notre étude, cette perte correspond à 63% de la perte totale en masse soit moins que les 84% annoncés par Slater *et al.*, malgré une vitesse de chauffe plus lente (5°C/min contre 10°C/min). La perte totale d'eau se situe dans la fourchette annoncée de Ca₂P₂O₇·nH₂O avec $3,8 < n < 4,2$ [Slater *et al.*, 2011]. Les données d'analyse thermique différentielle révèlent de plus un événement exothermique à 220°C pouvant correspondre à l'hydrolyse interne de la molécule de pyrophosphate. Cet événement semble plus marqué par rapport aux données de la littérature mais il se situe dans la même gamme de températures. Cette gamme correspond aussi à la gamme des événements exothermiques de la phase tétrahydratée.

Tableau IV-4 : Pertes de masse partielles de la phase amorphe a-CPP exprimées en nombre de molécules d'eau en fonction de la température de traitement calculées à partir des thermogrammes ATG

H ₂ O par Ca ₂ P ₂ O ₇	a-CPP
$\leq 30^{\circ}\text{C}$	0,31
30°C-200°C	2,13
200°C-500°C	1,43
Total	3,87

Des analyses par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sont en cours afin de caractériser plus finement les différents événements observés sur chacune des phases notamment en termes d'énergie et de réversibilité de l'événement. Cependant des analyses complémentaires par spectroscopie FTIR à température ambiante sur des échantillons ayant subi un traitement thermique et par DRX à température contrôlée ont été réalisées.

B2 b) Caractérisation par DRX et spectroscopie FTIR de l'Evolution de la phase m-CPPD en fonction de la température

Les évolutions de la phase m-CPPD en fonction de la température sont analysées par spectroscopie FTIR et diffraction de rayons X. Les températures utilisées, détaillées sur les figures IV-24 et IV-25, se situent dans une gamme de 30°C à 600°C. Les échantillons analysés par spectroscopie FTIR ont été préalablement chauffés à la température indiquée puis préparés pour l'analyse. Les acquisitions de diagrammes de diffraction ont été réalisées directement dans une chambre environnementale MRI modèle TC-radiation chauffée à la température d'analyse. Un vide partiel, 10^{-1} mbar, a été appliqué durant une partie de l'expérience DRX afin d'éviter l'accumulation de vapeur d'eau dans l'enceinte d'analyse. Des paliers en température de 30 min ont été effectués durant l'acquisition des données.

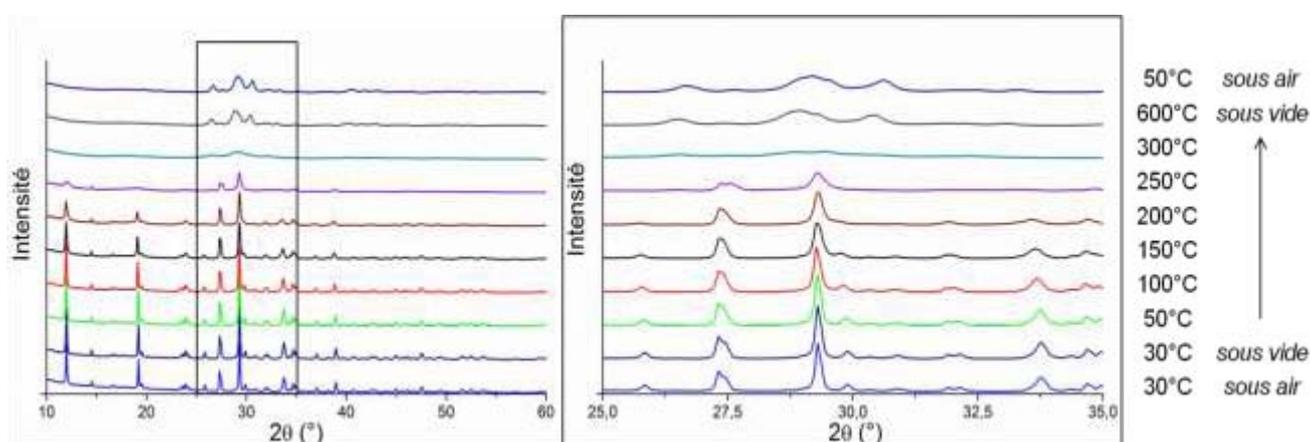


Figure IV-24 : Diagrammes de DRX montrant l'évolution de la phase m-CPPD en fonction de la température.

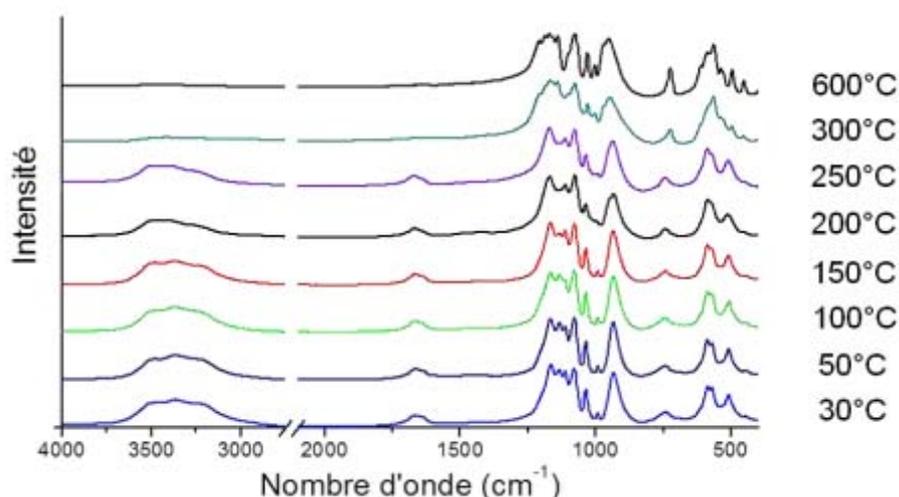


Figure IV-25 : Spectres d'absorption infrarouge des échantillons de m-CPPD après traitement en température.

Les analyses par DRX révèlent différents changements au sein de la phase m-CPPD au vu de l'évolution des diagrammes obtenus. Les changements sont continus, de 30°C à 200°C puis de 300°C à 600°C, et en particulier plus marqués à 250°C et 300°C.

Dans la gamme de température de 30°C à 200°C, une dilatation de la maille cristalline est observée par glissement des pics de diffraction à 12,1° et 19,2° sans modification des pics à 14,5° ni 29,3°. Cette évolution est compatible avec une augmentation du paramètre de maille *b* sans modification majeure des autres paramètres. Cette analyse est confirmée par l'affinement de Rietveld effectué sur le diagramme réalisé à 200°C et présenté dans le tableau IV-5. Dans la même gamme de température jusqu'à 150°C, les spectres FTIR ne présentent pas de modification majeure. Les bandes correspondantes aux vibrations des molécules d'eau et de pyrophosphate restent sensiblement identiques.

Tableau IV-5 : Paramètres de maille obtenus lors de l'étude de l'évolution de la phase m-CPPD à différentes températures 30°C et 200°C. Les écart-types estimés sont indiqués entre parenthèses.

	Réf.	Rp/ Rwp	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
m-CPPD	30°C	0,0772/0,1020	12,618(1)	9,250(1)	6,760(1)	90,00	104,97(1)	90,00
	200°C	0,0506/0,0716	12,624(1)	9,290(1)	6,755(1)	90,00	105,09(1)	90,00

A 250°C le diagramme de DRX évolue plus fortement avec notamment la modification du doublet de raies de diffraction visible entre 27,3° et 27,5°. Ces modifications pourraient correspondre à la formation d'une nouvelle phase cristalline, monohydratée d'après l'analyse ATG, dont les paramètres de maille et le groupe d'espace n'ont pu être déterminés. Ces évolutions sont corrélées avec des modifications des spectres FTIR à 200°C et 250°C. Les bandes à 3300 cm⁻¹, correspondant à une vibration associée aux molécules d'eau, et à 1134 cm⁻¹, $\nu^{\text{as}}_{\text{PO}_3}$, diminuent en intensité indiquant une modification de configuration et d'environnement des molécules de pyrophosphate et d'eau. Ces modifications sont reliées, par identification aux bandes de vibration modélisées par DFT, aux liaisons contenant les atomes d'oxygène O₄ et O₅ (Figure IV-26). Ces atomes sont impliqués dans les systèmes P₁-O₅-OW₂ et P₂-O₄-OW₁ correspondant aux bandes proches de 3300 cm⁻¹ pour O-H-OW et de 1134 cm⁻¹ pour P-O (figure IV-26). Les deux systèmes semblent équivalents d'après les modélisations effectuées. La phase cristalline intermédiaire, probablement un pyrophosphate de calcium monohydraté n'a pu être élucidé. Nous observons dans un troisième temps une évolution des diagrammes caractéristiques d'une amorphisation de la phase qui se poursuit à 300°C avec

l'apparition de la phase β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Les diagrammes DRX et les spectres FTIR observés à 300°C et 600°C correspondent en effet à la phase anhydre β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

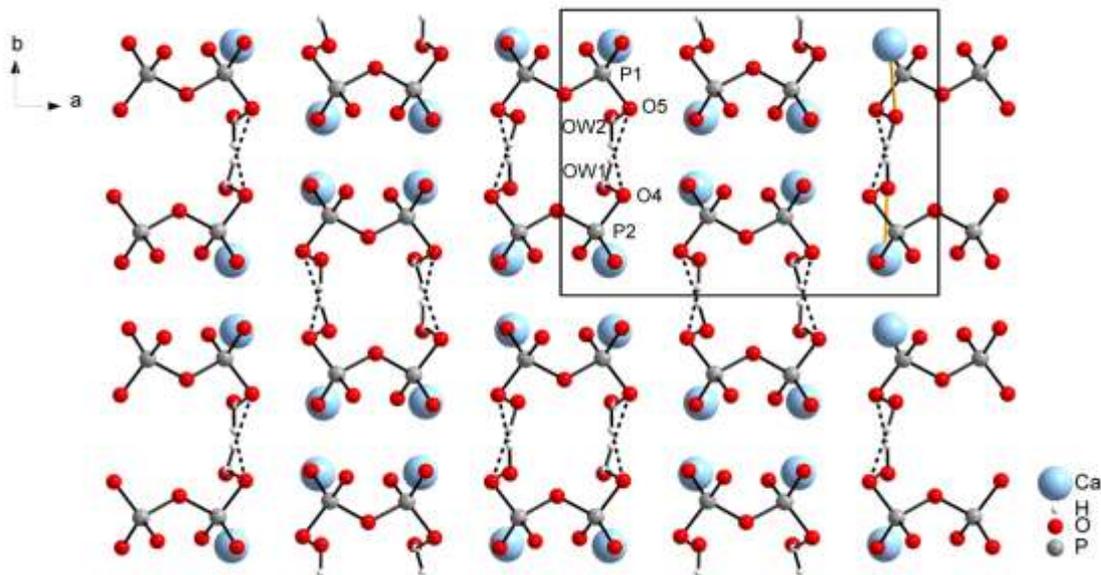


Figure IV-26 : Structure de la phase m-CPPD suivant l'axe [001]
Les liaisons hydrogène sont indiquées en pointillé.

B2 c) Caractérisation par DRX et spectroscopie FTIR de l'Evolution de la phase t-CPPD en température

Les évolutions de la phase t-CPPD en température sont analysées par spectroscopie FTIR et diffraction des rayons X. Les températures utilisées, détaillées sur les figures IV-27 et IV-28, se situent dans une gamme de 30°C à 600°C. Les conditions expérimentales sont identiques à celles reportées pour l'étude de la phase m-CPPD précédente.

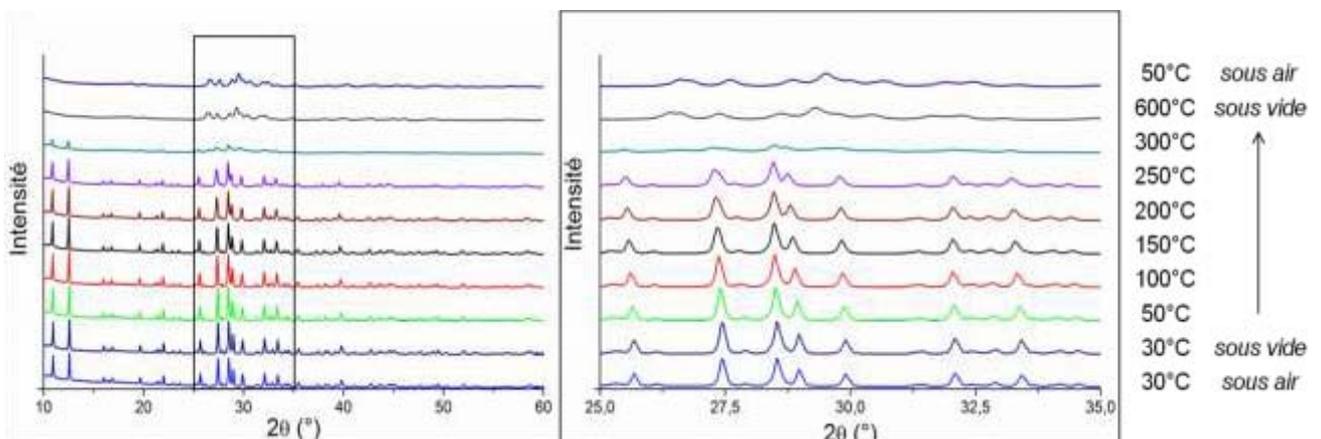


Figure IV-27 : Diagrammes de DRX montrant l'évolution de la phase t-CPPD en fonction de la température.

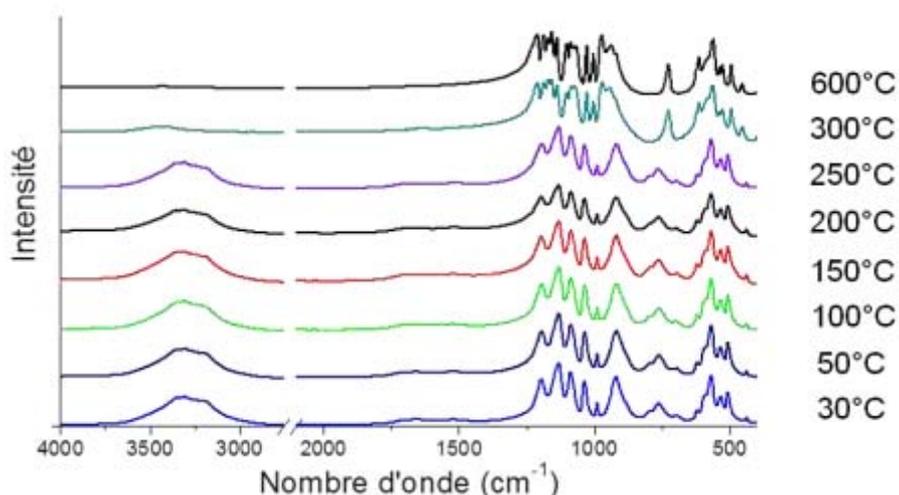


Figure IV-28 : Spectres d'absorption infrarouge des échantillons de t-CPPD après traitement à différentes températures.

Les analyses par DRX et par spectroscopie FTIR montrent une grande stabilité de la phase t-CPPD en température, jusqu'à 250°C. Les spectres FTIR particulièrement n'indiquent pas de perte d'eau à des températures inférieures à 300°C. Cependant, l'analyse par spectroscopie FTIR (Figure IV-28) étant réalisée sur des échantillons après leur traitement en température, et non pendant l'analyse thermique, une réhydratation de la phase traitée est possible au contact de l'air après retour à la température ambiante. L'analyse par DRX effectuée *in situ* (Figure IV-27) montre cependant que les modifications de structure subies lors de ces déshydratations sont mineures; l'examen des paramètres de maille déterminés après un traitement à 30°C et à 300°C révèle une dilatation de la maille à température élevée (tableau IV-6). Ce phénomène pourrait être expliqué par l'existence d'une base de pyrophosphate et de calcium relativement stable dans la phase t-CPPD, et formant des canaux visible sur la figure IV-29 où sont situées les molécules d'eau structurales. Ces canaux pourraient être un lieu d'échange entre le cristal et le milieu extérieur.

Tableau IV-6 : Paramètres de maille déterminés pour la phase t-CPPD traitée à 30°C et 300°C. Les écart-types estimés sont indiqués entre parenthèses.

	Réf.	Rp/ Rwp	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
t-CPPD	30°C	0,0382/0,00481	7,355(1)	8,274(1)	6,688(1)	102,85(1)	72,70(1)	94,96 (1)
	300°C	0,0484/0,0648	7,500(2)	8,343(2)	6,671(2)	102,71(2)	71,34(3)	96,62(3)

Les différences de coordination entre les molécules d'eau, deux coordinations pour O8 et une pour O9, pourraient indiquer la perte de la molécule O9 à plus basse température que la molécule O8.

L'analyse thermique montre cependant que les deux molécules d'eau sont libérées à la même température, vers 300° C. Les molécules d'eau sont liées entre elles par un réseau de liaisons hydrogène.

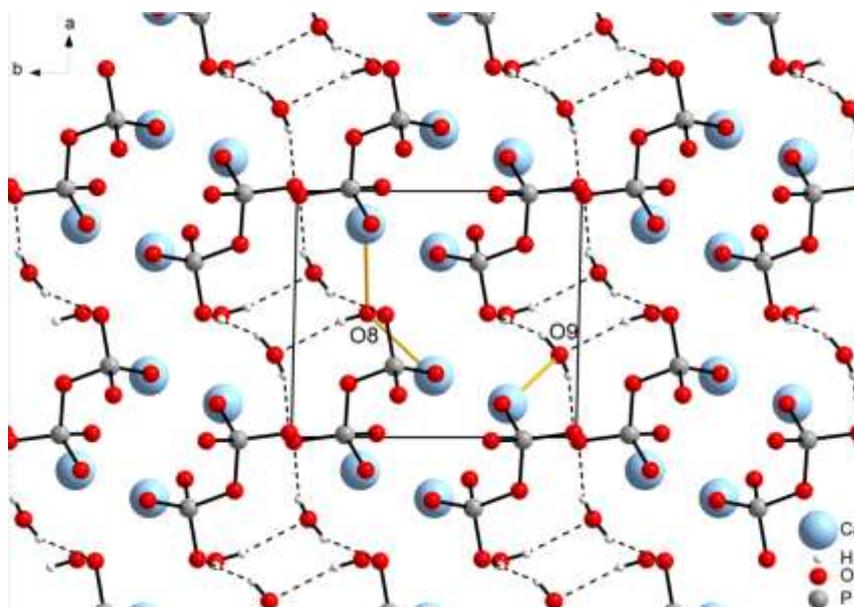


Figure IV-29 : Structure de la phase t-CPPD suivant l'axe [001] [Mandel, 1975]
Les liaisons hydrogène sont indiquées en pointillé

B2 d) Caractérisation de l'évolution de la phase m-CPPT β en température

Les évolutions de la phase m-CPPT β en fonction de la température sont analysées par spectroscopie FTIR et diffraction des rayons X dans les mêmes conditions que précédemment, à l'exception d'analyses sous atmosphère sèche d'argon effectué à la température ambiante.

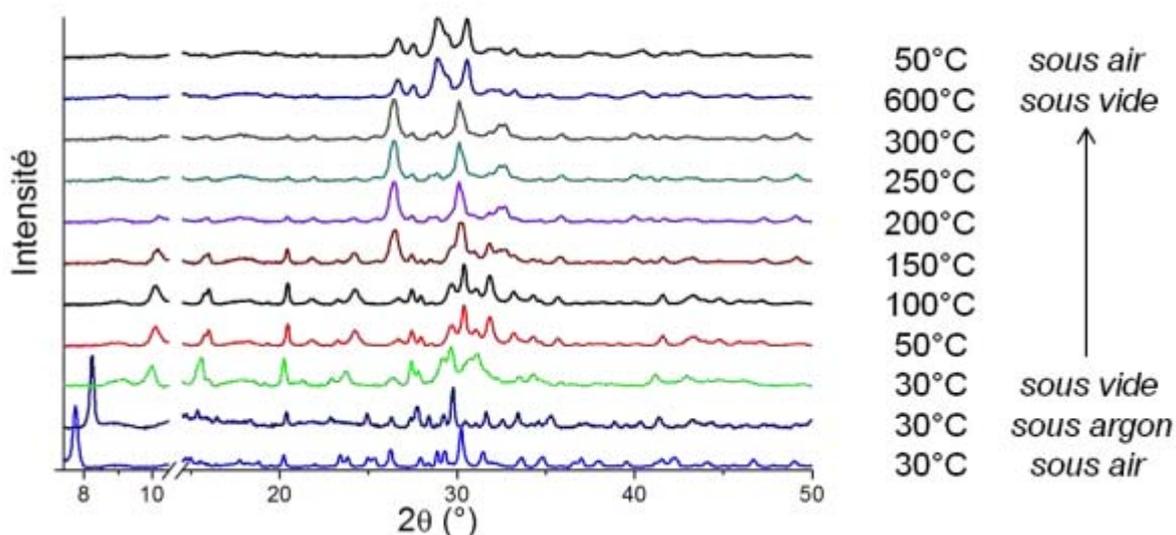


Figure IV-30 : Diagrammes de DRX montrant l'évolution de la phase m-CPPT β en fonction de la température. Le signal de la membrane kapton de la chambre environnementale, entre 11° et 14°, a été supprimé.

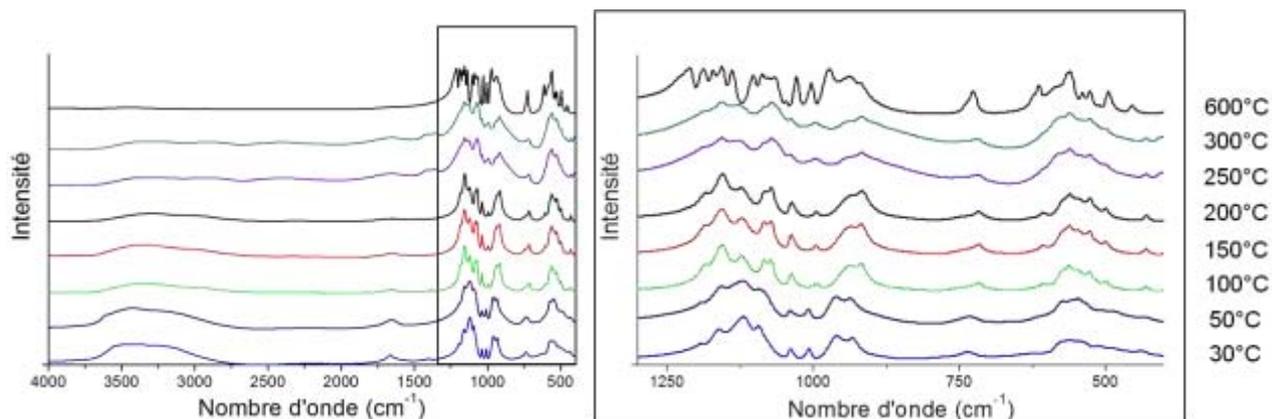


Figure IV-31 : Spectres d'absorption infrarouge des échantillons de m-CPPT β après traitement à différentes températures.

Les analyses DRX révèlent 6 diagrammes différents dont trois à 30°C liés à l'atmosphère environnant les cristaux (air, argon ou vide).

La phase m-CPPT β évolue en présence d'un air sec en u-CPP. Cette phase trihydratée est formée par la perte d'une molécule d'eau identifiée comme étant OW4 dans la structure de m-CPPT β . La molécule d'eau est en effet maintenue dans la structure uniquement par des liaisons hydrogène notamment avec les autres molécules d'eau. Ces liaisons faibles peuvent expliquer la perte de la molécule à 30°C sous air sec. Cette phase est cependant métastable, et elle se réhydrate en moins de 30 minutes lorsqu'elle est exposée à nouveau à l'air ambiant. La vitesse de réhydratation peut cependant être altérée notamment par la méthode de synthèse de la phase u-CPP. Les cristaux synthétisés directement sous cette forme, décrits dans la partie Chapitre IVA3, se réhydratent seulement au bout de plusieurs semaines. Ces variations pourraient provenir de défauts cristallins ou être liés à la taille des cristaux.

Tableau IV-7 : Paramètres de maille déterminés pour la phase m-CPPT β traitée à 30°C et 50°C sous différentes atmosphères. Les écart-types estimés sont indiqués entre parenthèses. * [Balić-Žunić *et al.*, 2000]

	Réf.	Rp/ Rwp	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
m-CPPT β	30°C	0,0738/0,1361	12,294(4)	7,519(2)	10,786(3)	90,00	112,48(3)	90,00
	*		12,287(6)	7,511(3)	10,775(5)	90,00	112,54(1)	90,00
u-CPP	30°C	0,0826/0,1173	11,405(1)	7,419(1)	10,860(1)	90,00	110,18(1)	90,00

mCPPM α	30°C	0,0981/0,1499	10,250(3)	7,178(2)	11,082(2)	90,00	120,43(2)	90,00
mCPPM β	50°C	0,0543/0,0752	10,541(2)	6,846(1)	11,148(2)	90,00	125,25(1)	90,00

Tableau IV-8 : Distance interplanaire $d_{(100)}$ des différentes phases hydratées de CPP.

	$d_{(100)}$ (Å)
m-CPPT β	11,360
[Balić-Žunić <i>et al.</i> , 2000]	11,348
u-CPP	10,705
m-CPPM α	8,838
m-CPPM β	8,608

Dans un deuxième temps, sous un vide de 10^{-1} mbar, la phase évolue à nouveau pour donner un diagramme de DRX ne comportant pas de pic aux environs de 8° . Comme l'indiquent les tableaux IV-7 et IV-8, la distance interplanaire $d_{(100)}$ diminue fortement, de 17%, entre la phase u-CPP et la phase suivante, dénommée m-CPPM α . Cette diminution marque une évolution importante dans la structure en couche de m-CPPT β qui peut être assimilée à la perte des deux molécules d'eau indexées OW2 et OW3. Bien que la structure de m-CPPM α n'ait pas été résolue, les similitudes avec la phase suivante m-CPPM β pourraient indiquer que la phase est monohydratée. Nous ne pouvons cependant pas affirmer que cette structure ne correspond pas à une structure m-CPPM β fortement déformée, formant un état intermédiaire instable vers celle-ci, ou à une phase différente. Cette phase est également métastable, se réhydratant à l'air ambiant pour reformer m-CPPT β . La formation de cette phase et sa réhydratation ont pu être observées à plus haute température, jusqu'à 150°C , dans une atmosphère riche en eau. Le chauffage de la phase m-CPPT β en milieu confiné notamment, sans balayage d'argon ou sans vide, y conduit. Notons qu'un échantillon de m-CPPT β mis sous vide évolue, d'après Mandel *et al.*, en une phase h-CPPD [Mandel *et al.*, 1988]. La comparaison des diagrammes de DRX obtenus, figures IV-19 et IV-32, avec celui de la phase h-CPPD indique cependant que la phase h-CPPD semble plus proche de u-CPP que des phases monohydratées (m-CPPM alpha et beta).

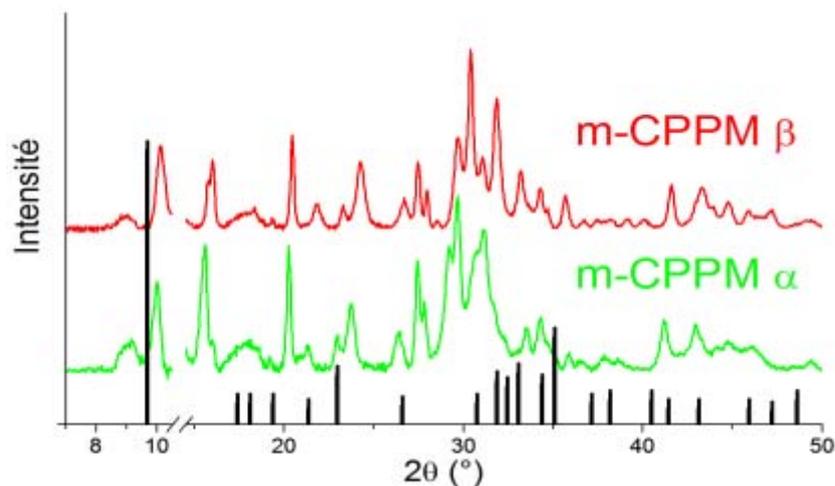


Figure IV-32 : Diagrammes de diffraction des rayons X des phases m-CPPM α et m-CPPM β

Les barres sous le diagramme correspondent aux intensités décrites par Mandel *et al.* pour la phase h-CPPD [Mandel *et al.*, 1988].

Au cours du chauffage au dessus de 30°C , le premier changement de phase est observé dès 50°C avec la transformation de m-CPPM α vers m-CPPM β . Bien que plus faibles que lors des précédentes transitions de phase, les changements de structure observés, ont cependant un effet important sur la stabilité de la phase. La phase m-CPPM β ne se réhydrate pas au contact de l'air ambiant contrairement à la phase m-CPPM α . Cette propriété a permis sa synthèse en grande quantité et sa caractérisation fine aboutissant à la résolution de la structure de cette phase présentée dans le chapitre III. La Figure IV-33 montre que la transformation en m-CPPM β induit probablement de fortes contraintes sur les cristaux ; les cristaux perdent en effet leur profil facetté pour un faciès plus courbe aux extrémités en cohérence avec les différences observées pour les paramètres de maille, notamment a , c et β , de ces deux phases. Après un traitement thermique à 600°C , les cristaux de CPP anhydre β obtenus possèdent une surface rugueuse et des faciès accidentés. En tenant compte de ces résultats relatifs à l'évolution en température ou sous vide de la phase m-CPPT β , nous pouvons avancer que tous les clichés MEB de la phase m-CPPT β présentés précédemment (Figure IV-5) correspondent en fait à des cristaux de m-CPPM α ou β en raison de la déshydratation induite par la mise sous vide des cristaux dans la chambre d'analyse du microscope électronique à balayage.

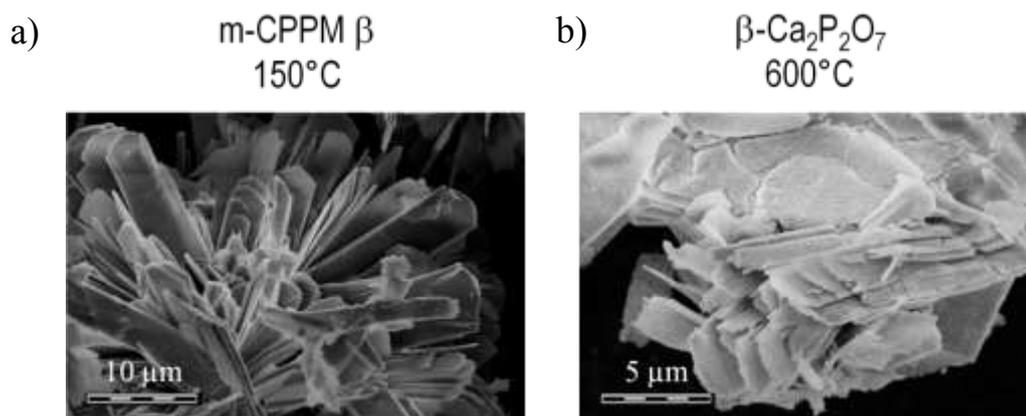


Figure IV-33 : Micrographies MEB de cristaux de m-CPPT β après traitement thermique (a) à 150°C et (b) à 600°C.

La structure de la phase m-CCPM β (alors dénommée m-CPPM) compte tenu de la méconnaissance de la phase m-CPPM α, a été présentée dans le chapitre III. La molécule d'eau restant dans cette structure correspond à la molécule OW1 de la structure de m-CPPT β, en accord avec le schéma de coordination de cette molécule [Balić-Žunić *et al.*, 2000]. La structure en couche est toujours apparente, les anciennes couches hydratées ayant disparu au profit d'une liaison de coordination unique entre celles-ci. Cette structure nous a en particulier permis de schématiser les différentes étapes de l'évolution de la phase m-CPPT β lors des premiers stades de déshydratation. L'évolution complète a été étudiée en couplant résolution de structure par diffraction des rayons X et calculs théoriques de la fonctionnelle de la densité (DFT), utilisée pour placer les hydrogènes et établir la structure de la phase métastable u-CPP (figure IV-34).

La structure de la phase m-CPPT β déterminée par Balić-Žunić *et al.* ne comportait pas d'atome d'hydrogène, la qualité du cristal utilisée ne permettant pas la résolution suffisante pour leur placement [Balić-Žunić *et al.*, 2000]. Les cristaux synthétisés dans la partie A2 ne permettant pas d'accroître la résolution de la structure de m-CPPT β, les positions des atomes d'hydrogène ont été obtenus par la modélisation du système complet utilisant la DFT. La structure de la phase u-CPP a été obtenue de la même façon à partir d'une structure m-CPPT β modifiée. La molécule OW4 a été retirée et les paramètres de maille ont été ajustés à ceux obtenus par analyse Rietveld. La structure de la phase monohydratée m-CPPM a été obtenue par diffraction des rayons X sur monocristal.

Comme l'indique la figure IV-34, le réseau de molécule d'eau évolue au cours de la déshydratation. Il forme une couche continue dans la structure de la phase m-CPPT β, les liaisons hydrogène connectant les molécules d'eau entre elles sur un plan (100). Deux couches composées d'ions pyrophosphate et calcium sont ainsi faiblement liées entre elles par ce réseau. Cette

organisation est perturbée par la perte de la molécule d'eau OW4, étant elle-même retenue dans la structure uniquement par liaison hydrogène. La modélisation de la structure u-CPP révèle que la cohésion des couches de pyrophosphate de calcium se fait suivant des axes privilégiés de liaisons hydrogène. La perte de la molécule OW4 est partiellement compensée par la rotation de la molécule OW2 et l'alignement des molécules OW3 sur ces liaisons. Finalement la perte des deux molécules OW2 et OW3 provoque la fermeture de l'espace précédemment occupé par l'eau de structure. La cohésion entre couche de pyrophosphate de calcium est alors assurée par une liaison entre l'ion calcium Ca²⁺ situé en bord de couche et l'atome O7 de la molécule de pyrophosphate. Ce même atome O7 est lié par liaison hydrogène à la dernière molécule d'eau OW1. Notons que les liaisons hydrogène ne sont plus orientées entre les couches mais au sein d'une même couche entre deux molécules de pyrophosphate.

Après la formation de la phase monohydratée m-CPPM, la prochaine transition de phase s'opère entre 150°C (DRX) et 200°C (spectroscopie FTIR). A ces températures, la phase monohydratée formée par déshydratation de la phase m-CPPT β ne subit pas une étape de déshydratation, contrairement à ce qui a été observé pour la phase synthétisée en réacteur chimique. L'apport d'énergie durant le chauffage est suffisamment important pour provoquer l'hydrolyse de la molécule de pyrophosphate en hydrogénophosphate suivant la réaction (II-6) et ainsi garder la dernière molécule d'eau. Ce composé est particulièrement visible sur les spectres FTIR grâce à ses bandes de vibration caractéristiques aux environs de 2400 cm⁻¹. La phase formée a été identifiée par diffraction des rayons X comme étant la phase monétite CaHPO₄.



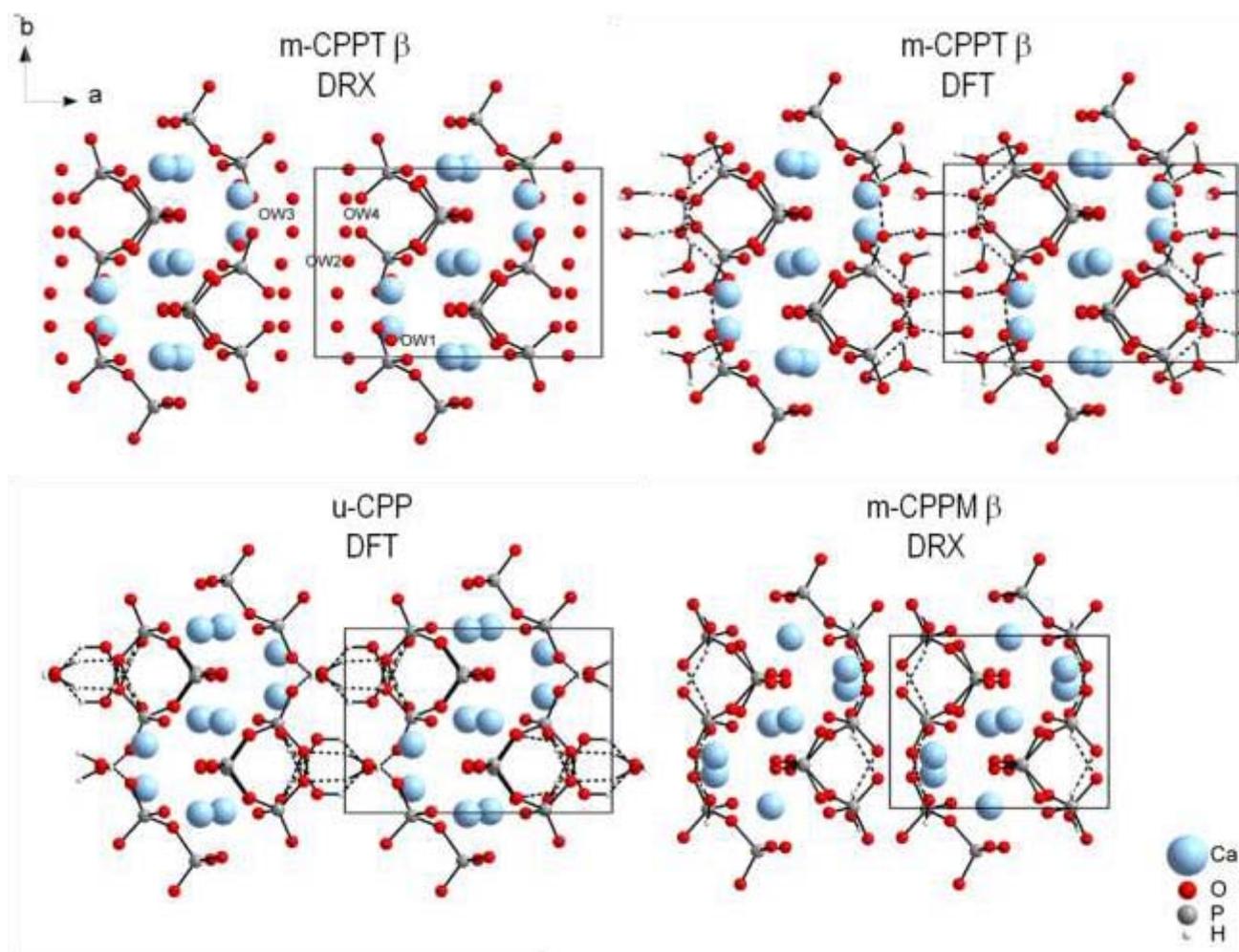


Figure IV-34 : Représentation des structures des phases impliquées lors de déshydratations successives de la phase m-CPPT β . Les liaisons hydrogène sont indiquées en pointillé

La transition de structure entre la phase m-CPPM β et la monéite est montrée sur la figure IV-35. Bien que les groupes d'espace soient différents, monoclinique $P2_1/n$ avec $a = 10,5406(4) \text{ \AA}$, $b = 6,8461(3) \text{ \AA}$, $c = 11,1482(4) \text{ \AA}$ et $\beta = 125,252(3)^\circ$ pour m-CPPM β et triclinique $P-1$ avec $a = 6,910(1) \text{ \AA}$, $b = 6,627(2) \text{ \AA}$, $c = 6,998(2) \text{ \AA}$, $\alpha = 96,34(2)^\circ$, $\beta = 103,82(2)^\circ$ et $\gamma = 88,33(2)^\circ$, les orientations présentées sur la figure IV-35 révèlent les similitudes de structure entre les deux phases. L'organisation de ce qui correspondait à l'intérieur de la couche de pyrophosphate de calcium reste quasiment inchangée dans les deux structures. Le losange formé, suivant ces vues, par deux ions pyrophosphates dans la structure m-CPPM β est toujours visible dans la structure de la monéite de même que les atomes de calcium Ca1. Les distances sont aussi peu modifiées, avec à titre d'exemple une distance entre les deux atomes de phosphore du losange décrit qui passe de $3,94(2) \text{ \AA}$ à $4,11(4) \text{ \AA}$.

Les principales modifications sont opérées dans la deuxième partie de la couche de pyrophosphate de calcium, pour les atomes précédemment en contact avec la couche hydratée. L'hydrolyse de la molécule de pyrophosphate, réalisée sur l'atome d'oxygène central, produit de ux

molécules d'hydrogénophosphate. La molécule encore contenue dans la partie « stable » de la structure porte un atome d'hydrogène sur l'atome O1 qui correspond de part sa position à l'ancien atome pontant de la molécule de pyrophosphate. La deuxième molécule d'hydrogénophosphate est liée par deux liaisons hydrogène, achevant ainsi de combler l'interstice laissé par le réseau de molécule d'eau dans la structure de m-CPPT β . Afin de former ces liaisons, un mouvement de translation suivant l'axe \vec{c} de la phase m-CPPM β de ces molécules est nécessaire. L'épaisseur de la couche de pyrophosphate de calcium hydratée, $d_{(100)}$, correspond à la distance $d_{(010)}$ dans la structure de la monétite soit une transition de 8,608 à 6,627 Å. La structure gagne ainsi encore en densité.

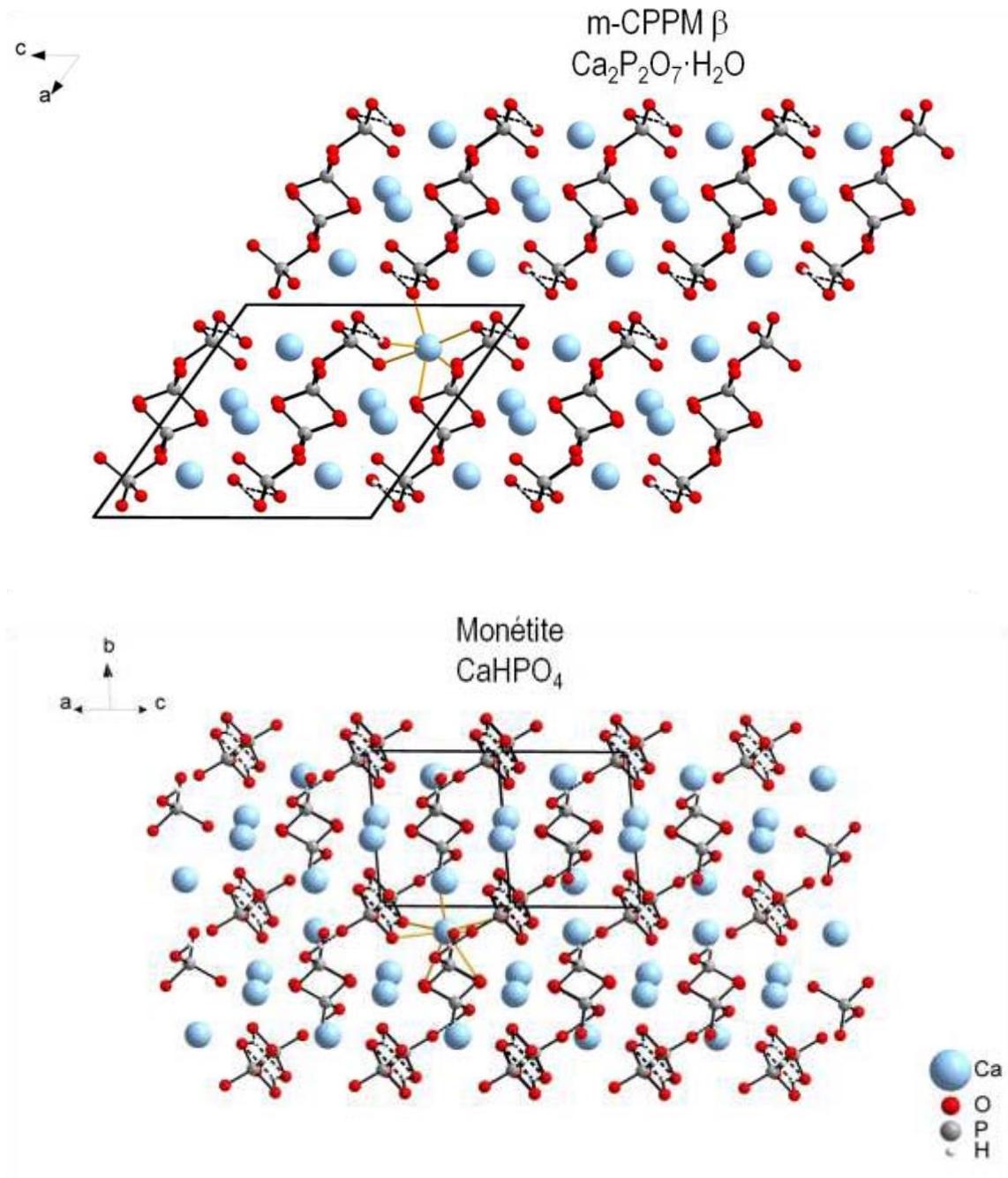


Figure IV-35 : Comparaison entre les structures de la phase m-CPPM β et de la monéite.

La dernière étape de la déshydratation consiste à la perte de la dernière molécule d'eau suivant l'équation chimique (IV-9) qui conduit à la formation de la phase anhydre β -Ca₂P₂O₇ :



La perte de la dernière molécule d'eau s'effectue à 350°C soit légèrement plus haut que pour les dernières étapes de déshydratation des phases dihydratées et presque à 100°C plus haut que lors de la déshydratation de la phase u-CPP synthétisée en réacteur.

Les similitudes entre les deux phases pourraient expliquer que l'hydrolyse intervienne dans ce mécanisme particulier de déshydratation, contrairement à ce qui a été observé pour les phases t-CPPD et m-CPPD. La structure en couches de ces phases permet aussi de nombreux échanges de molécule d'eau mais aussi, potentiellement, d'autres molécules ou ions à des fins de stockage.

A noter que le rendement d'hydrolyse est ici de 100%, tandis que l'hydrolyse observée dans la phase amorphe approximativement aux mêmes températures et mise en évidence par Slater *et al.* ne concerne qu'une faible proportion de molécule de pyrophosphate [Slater *et al.*, 2011]. Dans tout les cas, l'hydrolyse est expliquée comme une conséquence de l'orientation et de la proximité entre les molécules de pyrophosphate, et notamment de l'oxygène pontant, avec au moins une molécule d'eau. L'étude présentée ici peut permettre une meilleure compréhension des mécanismes opérants dans des phases amorphes contenant des ions pyrophosphate ou polyphosphate, notamment les verres contenant du phosphore.

C. Conclusions

Différentes évolutions des phases de pyrophosphate de calcium hydraté ont été étudiées dans plusieurs systèmes, en solution ou en gel ou encore à différentes températures en utilisant différents protocoles et techniques de caractérisation complémentaires.

Les évolutions notamment de la phase amorphe, mais aussi de phases métastables comme la phase u-CPP, ont permis de mieux comprendre les mécanismes de croissance des phases de pyrophosphate de calcium hydraté et les changements de phase observés. Ces connaissances pourront être utilisées afin de mieux comprendre le développement de cristaux *in vivo* mais aussi *in vitro*. La mise au point d'un système de croissance en gel à partir de ces résultats a ainsi permis la synthèse de cristaux de taille suffisante pour la résolution de structure sur monocristal. Le système reste cependant à affiner afin de rejoindre les domaines d'évolution ciblés, notamment en température.

Les évolutions des phases de CPP en température ont aussi été analysées. Ces études ont permis de décrire plusieurs phénomènes de déshydratation opérant pour chacune de phases hydratées étudiées. Ces mécanismes sont en partie reliés à la structure de ces phases et une analyse fine a permis de relier pour la première fois celles-ci à des réactions chimiques tels que l'hydrolyse interne de la molécule de pyrophosphate. Ces comportements de phases cristallines pourront servir de modèle à des phases non structurées telles que la phase amorphe a-CPP subissant elle aussi une hydrolyse interne à haute température.

En conclusion, plusieurs phénomènes, de croissance cristalline, de transition de phase ou de réaction chimique, liés aux évolutions des pyrophosphates de calcium hydratés ont été décrits dans ce chapitre et pourront servir de bases afin de décrire de mieux comprendre ou appréhender les différentes observations faites sur ces phases, notamment *in vivo*.

Chapitre V

Analyse de spécimens biologiques
et évaluation *in vitro* des phases
de pyrophosphate de calcium hydratées

Les études physico-chimiques et structurales présentées dans les chapitres précédents ont contribué à une meilleure connaissance des phases de pyrophosphate de calcium hydratées d'intérêt biologique et à formuler des hypothèses quant à leur rôle potentiel dans l'initiation et/ou le développement de l'inflammation ostéo-articulaire et de la maladie.

Dans une dernière partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de spécimens biologiques ainsi qu'au comportement *in vitro* de cellules macrophages en présence de phases synthétiques de CPP hydraté avec pour objectif d'identifier les variétés de CPP hydraté qui sont présentes dans les tissus pathologiques et de mieux appréhender le rôle de ces cristaux dans la réponse inflammatoire des cellules et l'évolution de la maladie. Ces études ont été réalisées en collaboration avec le Pr Frédéric LIOTE et le Dr Korng EA de l'INSERM U606 à l'Hôpital Lariboisière (Paris) dans le cadre du projet ANR CAPYROSIS (2013-2017) et d'un projet sur la ligne CRISTAL du synchrotron Soleil (Proposal n°20130932, 19-22 février 2014 - *Structural investigations on hydrated calcium pyrophosphate phases of biological interest: study on synthetic and biological samples*).

Nous présentons dans ce chapitre les différentes caractérisations effectuées *ex vivo* sur des échantillons biologiques, incluant des prélèvements de ménisques et de liquides synoviaux de patients arthritiques, ainsi que les tests cellulaires réalisés *in vitro* sur les différentes phases de CPP hydratées synthétisées au laboratoire (cf. Chapitre II). Après une brève revue bibliographique des techniques déjà mises en œuvre pour l'étude des cristaux présents dans les articulations de patients arthritiques, nous présentons les différents outils d'analyse que nous avons utilisés, principalement la diffraction des rayons X et la micro-spectroscopie Raman, afin d'identifier les phases de CPP présentes dans les tissus biologiques de patients malades. Enfin, les résultats préliminaires de l'étude *in vitro* du potentiel inflammatoire des variétés de CPP hydraté en présence de cellules macrophages clôturent ce chapitre.

A. Analyses de ménisques et liquides synoviaux *ex vivo*

Cette partie présente les résultats de caractérisation de ménisques et liquides synoviaux prélevés sur des malades identifiés atteints de chondrocalcinose. Différents outils d'analyse ont été utilisés, principalement la diffraction des rayons X et la spectroscopie Raman, afin d'identifier les phases de CPP présentes dans les tissus biologiques.

Etudier les fluides et tissus biologiques appelle à s'intéresser aux différentes méthodes d'analyse des spécimens biologiques en vue de mieux appréhender les avantages et inconvénients de ces méthodes et notamment le risque de modification/transformation des échantillons au cours des étapes de préparation ou d'analyse des spécimens. Nous présentons ci-après une brève revue bibliographique

sur les techniques d'analyses reportées dans la littérature pour l'étude des cristaux dans ce type de matériels biologiques.

A1. Etude bibliographique

Plusieurs techniques ont été utilisées pour détecter les cristaux présents dans les articulations de patients arthritiques. Yavorsky *et al.* ont recensé ces différentes techniques dans le III-1 [Yavorsky *et al.*, 2008].

Tableau V-1 : Méthodes analytiques utilisées pour la détection de cristaux [Yavorsky *et al.*, 2008]

Technique	Avantages	Inconvénients
<i>Imagerie</i>		
Microscope optique et lumière polarisée	Peu cher, largement accessible et utilisable sur les gros cristaux (>1 µm)	Peu précise, non spécifique et ne peut pas détecter des cristaux de petite taille. La microscopie polarisée peut faciliter la détection de gros cristaux.
Microscopie avec coloration	Bon marché, largement disponible et peut identifier des amas de cristaux	Sensible mais non spécifique, des résultats faux positifs sont fréquents. Un seul colorant ne suffit pas à faire la distinction entre les différents types de cristaux
Microscopie multidimensionnelle	Le couplage de micro-spectrophotomètre multicanaux et système d'imagerie 3-D	Peu répandu. Aucune preuve de l'identification claire de cristaux dans le liquide synovial
Microscopie électronique en transmission	Petite taille de l'échantillon et possibilité d'utilisation de la diffraction électronique	Coûteux, complexe, peu répandu, opérateur-dépendant
Microscopie électronique à balayage	Petite taille de l'échantillon et peut être couplée à une analyse élémentaire par rayons X	Coûteux, complexe, repose sur la morphologie
Microscopie à force atomique	Petite taille de l'échantillon, préparation de l'échantillon minimale. Peut mesurer la dureté et certains paramètres morphologiques utilisables pour l'identification. L'utilisation de fonction chimique peut la rendre plus spécifique.	Dépendant de l'opérateur, complexe à utiliser sur des échantillons liquides, repose sur l'analyse de la morphologie

Technique	Avantages	Inconvénients
<i>Méthodes spectroscopiques</i>		
FTIR	Précis, utilisé pour des méthodes de reconnaissance automatique	Peut être mal interprétée et l'eau interfère dans certaines parties du spectre
Raman	Précis, l'eau n'interfère pas, signatures spectrales uniques pour chaque phase cristalline	Relativement cher, bibliothèques de spectres moins fournies. Purification de l'échantillon nécessaire pour distinguer les différents types de cristaux
Fluorescence	Peut être très sensible et sélective avec des colorants appropriés	Nécessite un équipement spécial; les colorants peuvent être coûteux, ne convient pas pour une utilisation <i>in vivo</i>
RMN/IRM	Permet de visualiser la plupart des types de pathologies, y compris les dépôts de cristaux	Très cher, ne peut pas identifier la nature des dépôts de cristaux. Dépendant de l'opérateur
<i>Autres méthodes</i>		
Analyse élémentaire calcium et phosphore	Analyses telles que la spectrométrie atomique, spectrophotométrie UV-Vis, etc, peuvent être sensibles et sélectives	Pratique dans l'analyse des cristaux dissociés, d'autres matières présentes dans le fluide peuvent interférer
Diffraction des rayons X	Technique précise pour l'identification sans ambiguïté	Nécessite un échantillon cristallisé, pur, séché et en quantité suffisante
Electrophorèse capillaire	Peut être utilisé pour l'analyse de liquides synoviaux contenant des cristaux	Non applicable pour la séparation directe de cristaux

Plusieurs de ces techniques ont été utilisées pour la caractérisation de dépôts de pyrophosphate de calcium *ex vivo* : par microscopies optique [Ivorra *et al.*, 1999; Eliseo & Vega, 2005; Omura *et al.*, 2010], électronique et à force atomique [Blair *et al.*, 1995; Fuerst *et al.*, 2010], spectroscopies FTIR [Kohn *et al.*, 1962; Rosenthal *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2011] et Raman [Fuerst *et al.*, 2010] et diffraction des rayons X [Kohn *et al.*, 1962; Liu *et al.*, 2009]. La plupart de ces techniques manquaient cependant de références concernant la phase m-CPPD, celle-ci étant peu décrite *in vitro*. Les descriptions, hormis par DRX, faisaient ainsi généralement état de la présence de la phase t-CPPD, sans mentionner la phase m-CPPD. Les échantillons analysés par DRX avaient cependant subi un traitement avant analyse pour éliminer la partie organique afin d'obtenir un signal plus intense [Liu *et al.*, 2009]. L'effet de ce traitement, incluant des enzymes et différents pHs, sur l'évolution des différentes phases de CPP n'a cependant pas été discuté par les auteurs.

Certaines des références utiles pour la caractérisation de la phase m-CPPD ont été présentées précédemment dans le chapitre qui concerne les caractérisations des phases CPP synthétisées *in vitro* (cf. Chapitre II).

Une étude de prélèvements de ménisques et de liquides synoviaux de patients malades a ainsi été réalisée afin d'estimer le potentiel de certaines techniques à identifier distinctement notamment les phases dihydratées de CPP qui sont les plus reportées dans la littérature : m-CPPD et t-CPPD et déceler éventuellement d'autres phases.

A2. Analyse par diffraction des rayons X de cristaux issus de ménisque et de liquides synoviaux

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Hang-Korng Ea et Frédéric Lioté du laboratoire Inserm U606 de l'Hôpital Lariboisière à Paris, Erik Elkaim du synchrotron Soleil à Gif sur Yvette et Dominique Bazin du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris.

A2 a) Préparation des échantillons

Les échantillons ont été prélevés lors de la mise en place d'une prothèse totale de genou pour gonarthrose. Les échantillons ont été lavés avec un tampon de phosphate de sodium (tampon PBS) puis fixés dans l'alcool à 70%. Une à deux tranches ont été prélevées par ménisque puis cryo-broyées dans un mortier à l'azote liquide. 25 échantillons de ménisques, internes et externes, provenant de 10 patients ont ainsi été préparés. Les échantillons ont été conservés à -20°C pour analyse.

Ce protocole incluant une étape de cryo-broyage a été choisi pour éviter toute modification des différentes phases présentes dans l'échantillon, notamment de la phase amorphe a-CPP

potentiellement présente.

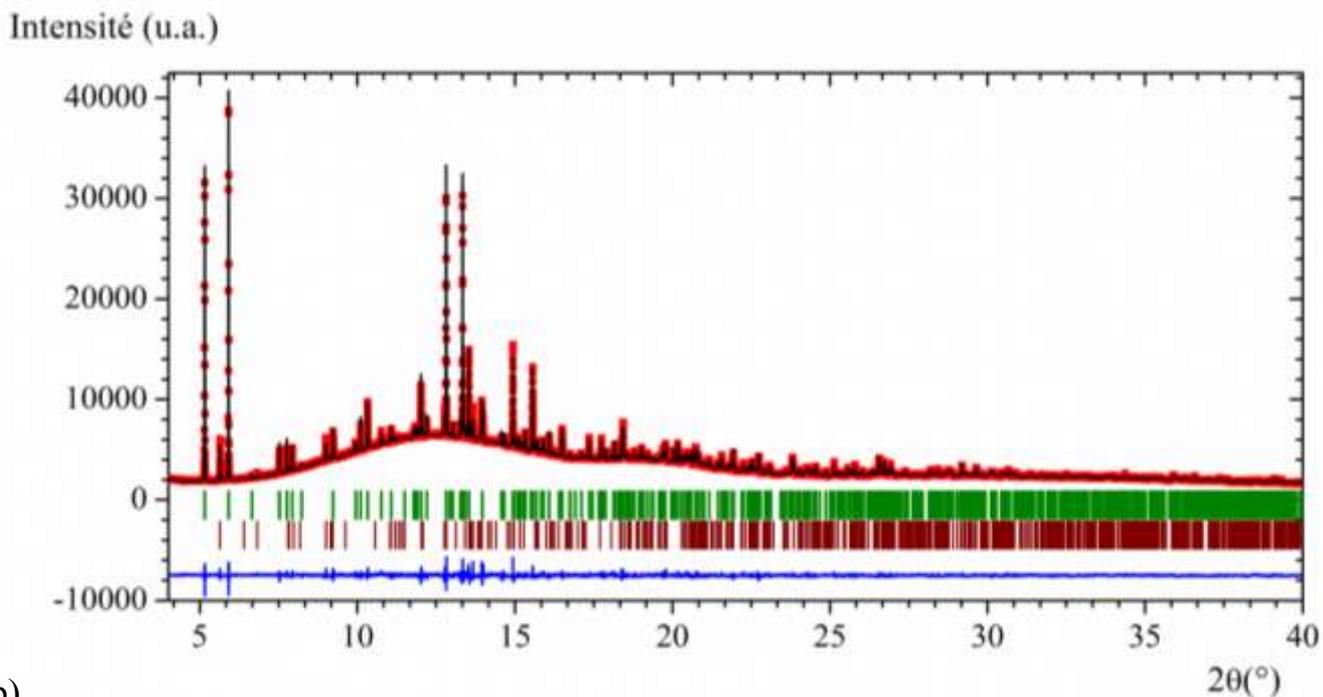
Les échantillons ont été placés tels quels dans des capillaires de diamètre 0,7 mm et analysés par diffraction des rayons X sur la ligne Cristal du synchrotron Soleil dans les mêmes conditions que les échantillons synthétiques (cf. chapitre III3). Les capillaires ont été analysés en plusieurs points, 3 ou plus, pour s'assurer de l'homogénéité de l'échantillon analysé.

L'utilisation du rayonnement synchrotron permet la détection, dans un temps relativement court, de faible quantité de cristaux et rend leur identification plus aisée en réduisant les éventuels recouvrements pouvant avoir lieu entre les faisceaux diffractés. Nous avons donc mis à profit ces avantages pour cette étude préliminaire mais une étude plus large à l'aide d'un diffractomètre RX de laboratoire peut être envisagée avec une statistique de comptage adaptée.

A2 b) Identification des phases de CPP dans les spécimens biologiques

Les diagrammes de DRX de deux spécimens biologiques provenant de deux patients sont présentés sur la figure V-1. Deux phases de pyrophosphate de calcium ont été détectées dans 12 des échantillons analysés issus de prélèvements chez quatre patients. Les proportions relatives entre les phases t-CPPD et m-CPPD ainsi que la quantité totale de matière cristallisée seront examinées plus loin dans ce chapitre. Aucune autre phase cristalline n'a été détectée pour l'ensemble des échantillons analysés, ni de pyrophosphate de calcium, ni d'orthophosphate de calcium. Par ailleurs, on remarque que plusieurs larges halos correspondant vraisemblablement à de la matière organique amorphe, sont également visibles sur chacun des diagrammes de diffraction.

a)



b)

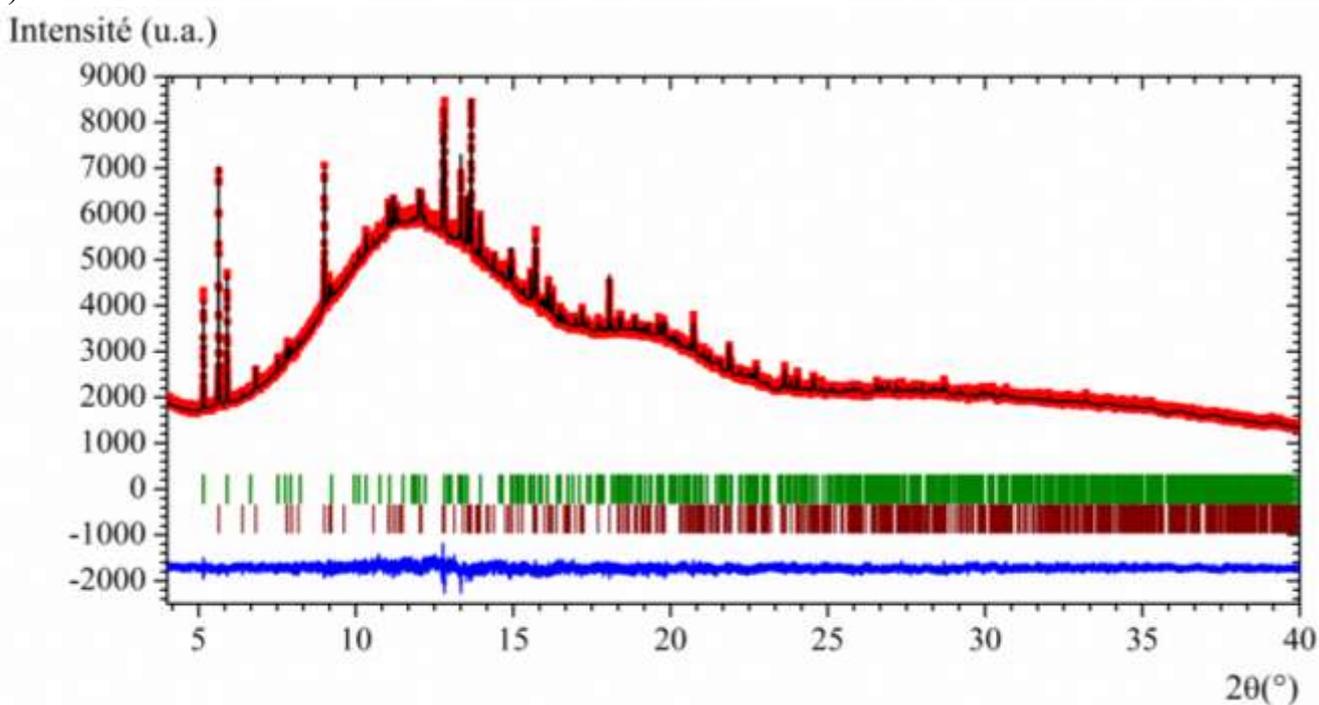
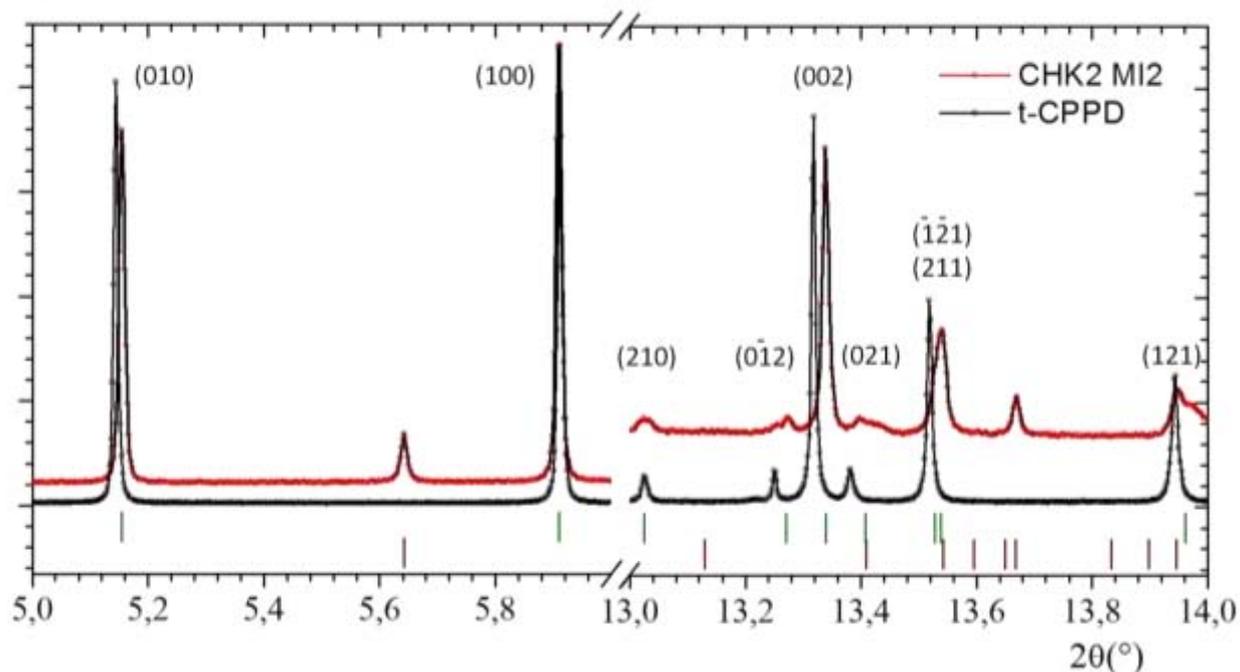


Figure V-1 : Diagrammes de diffraction RX issus de l'analyse de ménisques a) CHK2 MI2 et b) CHK10 ME provenant de deux patients. Les données acquises sont représentées par des points rouges, le profil simulé par une ligne noire et la différence par une ligne bleue. Les barres verticales indiquent les positions des pics de Bragg pour la phase t-CPPD (haut) et m-CPPD (bas).

Si on compare les diagrammes de RX obtenus pour les spécimens biologiques et les échantillons synthétiques purs (m-CPPD et t-CPPD), on remarque que les diagrammes sont légèrement différents (Figure V-2).

a)

Intensité



b)

Intensité

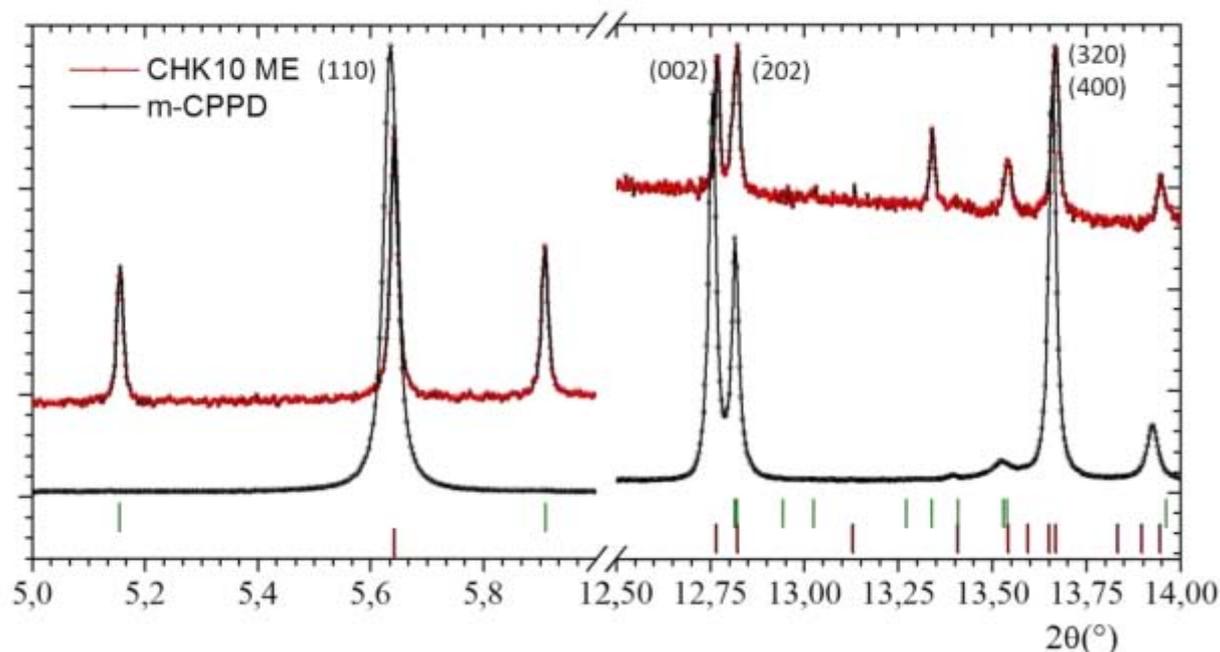


Figure V-2 : Diagrammes de diffraction RX issus de l'analyse de ménisques a) CHK2 MI2 et b) CHK10 ME provenant de deux patients. Comparaison avec les diagrammes RX des phases t-CPPD et m-CPPD synthétiques. Les barres verticales indiquent les positions des pics de Bragg pour la phase t-CPPD (haut) et m-CPPD (bas) *in vivo*.

Certains décalages de pics de diffraction sont ainsi visibles entre les deux diagrammes. Ces différences peuvent être expliquées, en partie au moins, par une dilatation des paramètres de maille des composés synthétiques lors de l'analyse due à la forte puissance du faisceau synchrotron incident fortement absorbé par ces échantillons. Les échantillons de ménisque sont eux dilués par la matière

organique et pourraient ne pas subir les mêmes effets. La présence d'impureté, notamment cationique, n'est pas non plus à exclure.

On remarque en particulier que la raie (110) de la phase m-CPPD *in vivo* possède une largeur à mi-hauteur significativement plus faible que celle de la phase m-CPPD synthétisée *in vitro*. Un résultat similaire est observé pour la raie (020). Cela indique que la cristallinité des cristaux contenus dans les échantillons de ménisque est supérieure à celle des cristaux synthétiques, du moins dans ces orientations. Les analyses MET ayant prouvé la mauvaise qualité des cristaux synthétiques sur cette face notamment (cf. Chapitre III), ce résultat indiquerait que les cristaux biologiques possèdent des morphologies mieux définies sans doute reliées à des temps de maturation plus longs.

A2 c) Analyse quantitative

L'analyse DRX nous permettant d'analyser de grandes quantités de cristaux, une analyse statistiquement significative du ratio entre chacune des phases est possible. Les résultats des analyses DRX ont été traités par la méthode PONKCS (Partial Or No Known Crystal Structures [Scarlett & Madsen, 2006]) afin d'obtenir le rapport entre les phases m-CPPD et t-CPPD (méthode Rietveld) et un indice de la « minéralisation » des ménisques, estimée par comparaison avec le fond continu supposé constant d'un échantillon à l'autre. L'aire du fond continu a ainsi été traitée par la méthode PONKCS comme une phase amorphe quelconque ayant la densité d'un pyrophosphate de calcium, ceci afin de rendre les calculs plus intuitifs. Cette identification permet l'attribution d'un rapport entre phase amorphe et phase cristallisée (Tableau V-2). Le rapport entre les aires des phases cristallines, telles que obtenues par la méthode Rietveld, et l'aire totale du fond continu renvoie ainsi à la quantité de phase cristalline diluée dans l'échantillon amorphe (matrice organique) et donc à la « minéralisation » relative du ménisque. Nous avons vérifié que l'aire de la phase amorphe ainsi décrite ne varie que faiblement d'un échantillon à l'autre et que la minéralisation ne varient pas globalement au sein du capillaire ; les variations locales étant principalement dues à la mise en capillaire. Afin d'augmenter la statistique de comptage, l'ensemble des diagrammes ont été additionnée après vérification.

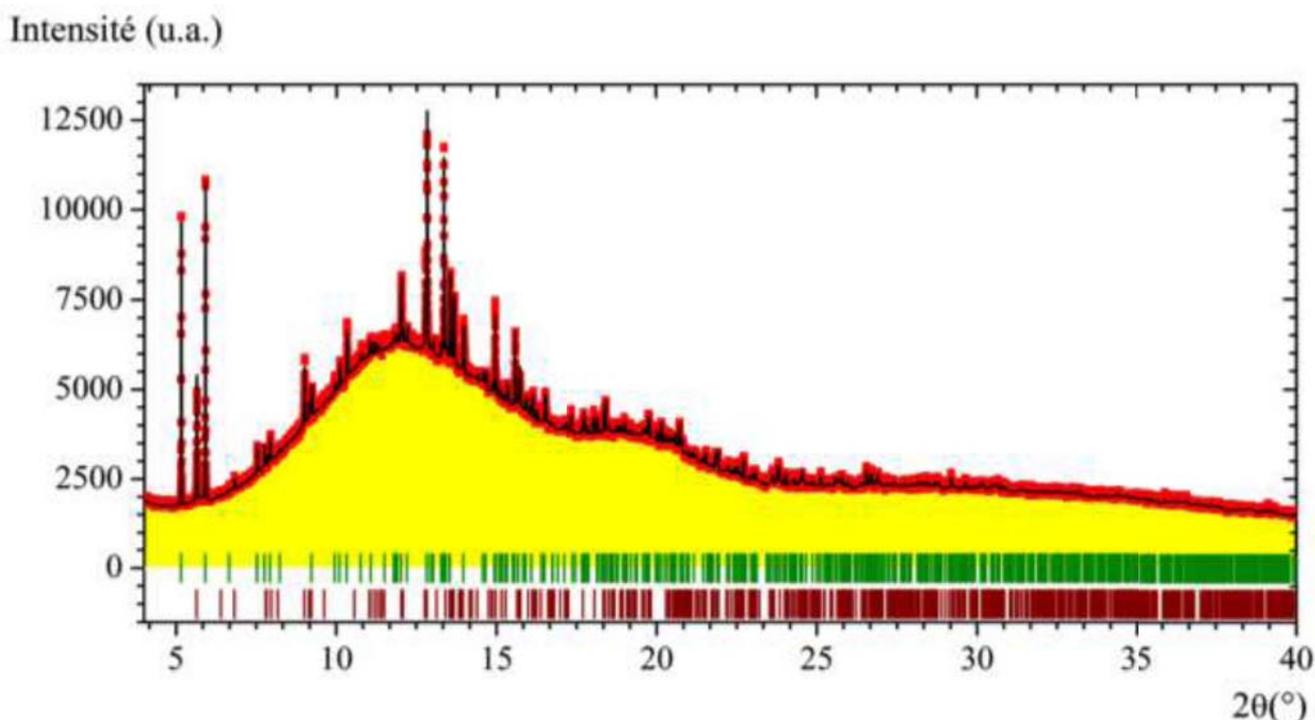


Figure V-3 : Diagrammes de diffraction des RX issus de l'analyse de ménisques CHK5 ME1 montrant l'aire du fond continu (jaune) utilisé pour estimer la minéralisation du ménisque étudié. L'aire sous les pics est obtenue par la méthode Rietveld. Les barres verticales indiquent les positions des pics de Bragg pour la phase t-CPPD (haut) et m-CPPD (bas) *in vivo*.

En raison de la faible quantité de données disponibles dans la littérature, aucune conclusion ne peut être avancée. On remarque cependant que la phase m-CPPD est présente majoritairement chez les patients ayant une quantité de phases cristallisées globalement faible, ménisques intérieur et extérieur compris. La quantité de cristaux de la phase m-CPPD, représentée par le facteur d'échelle ou plus simplement par l'intensité des pics de m-CPPD, varie sur une gamme plus faible que celle de la phase t-CPPD.

On remarque ainsi que 7000 u.a. semble être une valeur maximale d'intensité atteinte pour le pic (110) de la phase m-CPPD dans ces conditions d'acquisition, ce qui représente un facteur d'échelle de $14,2 \cdot 10^{-6}$. Comparativement, la quantité de cristaux de la phase t-CPPD peut atteindre une valeur de facteur d'échelle de $265 \cdot 10^{-6}$. Ce résultat rejoindrait les études précédentes qui ont montré que le m-CPPD est une phase métastable évoluant vers la phase t-CPPD [Brown *et al.*, 1963; Mandel *et al.*, 1988]; elle apparaîtrait plus tôt, dans des zones faiblement minéralisées et la quantité maximale de cristaux de m-CPPD serait régulée par la vitesse de transition de phase vers le t-CPPD.

Tableau V-2 : Proportion relative des phases t-CPPD et m-CPPD, et rapport des aires des phases cristallines par rapport à l'aire totale sous la courbe (minéralisation).

		mCPPD (%)	tCPPD (%)	Minéralisation (u.a)
CHK2	ME	27	73	1,3
	MI1	15	85	5,3
	MI2	9	91	6,6
CHK3	ME	0	0	
	MI	0	0	
CHK4	ME	0	0	
	MI	0	0	
CHK5	ME1	28	72	3,4
	ME2	22	78	1,2
	MI1	30	70	4,1
	MI2	11	89	0,3
CHK9	ME	0	0	
	MI	0	0	
CHK10	ME	72	27	2,3
	MI1	37	63	0,5
	MI2	29	71	0,5
CHK11	ME	0	0	
	MI1	0	0	
	MI2	0	0	
CHK12	ME	0	0	
	MI	0	0	
CHK13	ME	0	0	
	MI	75	25	1,7
CHK14	ME	0	0	
	MI	0	0	

CHK n : Identifiant du patient, ME : Ménisque Externe, MI : Ménisque Interne

Des résultats similaires peuvent être observés sur les diffractogrammes de RX de cartilages extraits de genoux de patients arthritiques présentés par Liu *et al.* et reproduits sur la figure V-4, bien que ceux-ci n'aient pas été commentés dans ce sens [Liu *et al.*, 2009]. Les échantillons ayant été traités pour enlever la phase organique, l'intensité du signal est donc équivalente à la minéralisation du cartilage. On observe que le ratio m-CPPD/t-CPPD est plus élevé pour les diffractogrammes ayant une intensité globale plus faible. La quantité totale de cristaux de la phase m-CPPD présente ici aussi une variation moins importante que celle de t-CPPD, avec une valeur maximale d'intensité de l'ordre de 1000 coups.

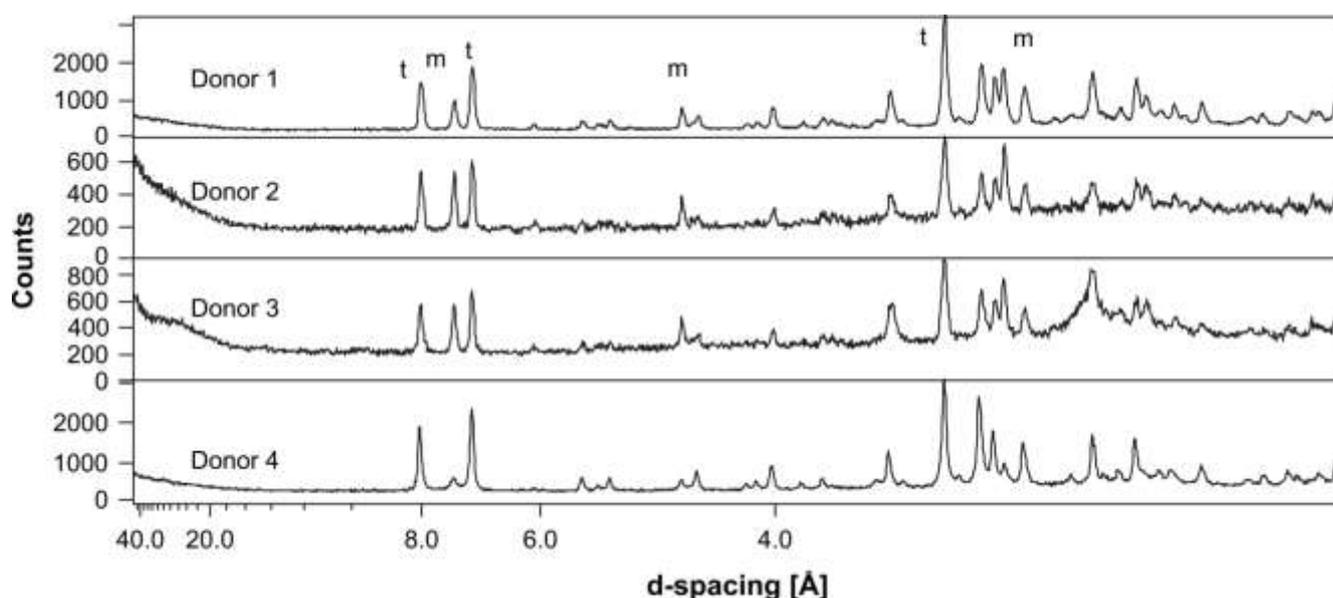


Figure V-4 : Diffractogrammes de RX de cartilages extraits de genou de patients arthritiques [Liu *et al.*, 2009]

Ces résultats restent à confirmer par une étude plus étendue sur un plus grand nombre de cartilages ou ménisques mais ils pourraient indiquer une formation de la phase m-CPPD dans les premiers stades puis une évolution vers la phase t-CPPD. Les prélèvements ayant été réalisés sur des articulations nécessitant la pose de prothèse de genou, l'évolution de la quantité de cristaux au cours de l'évolution de la maladie, notamment lors des premiers stades, n'a pas pu être étudiée.

Par ailleurs, des analyses DRX de liquides synoviaux ont été réalisées afin de démontrer l'efficacité de cette technique de caractérisation dans un milieu fortement dilué mais dont l'échantillon peut être extrait sans chirurgie lourde. Un échantillon de liquide synovial centrifugé a ainsi été analysé sans autre traitement. Le signal de la phase t-CPPD est visible sur le diffractogramme de RX malgré la grande proportion de fond continu (Figure V-5). Un traitement préalable visant à réduire la quantité de matière organique pourrait être utilisé afin d'effectuer une caractérisation du liquide synovial à différents stades d'inflammation. Plusieurs protocoles ont été testés mais l'influence de ces traitements sur les phases de CPP reste à déterminer.

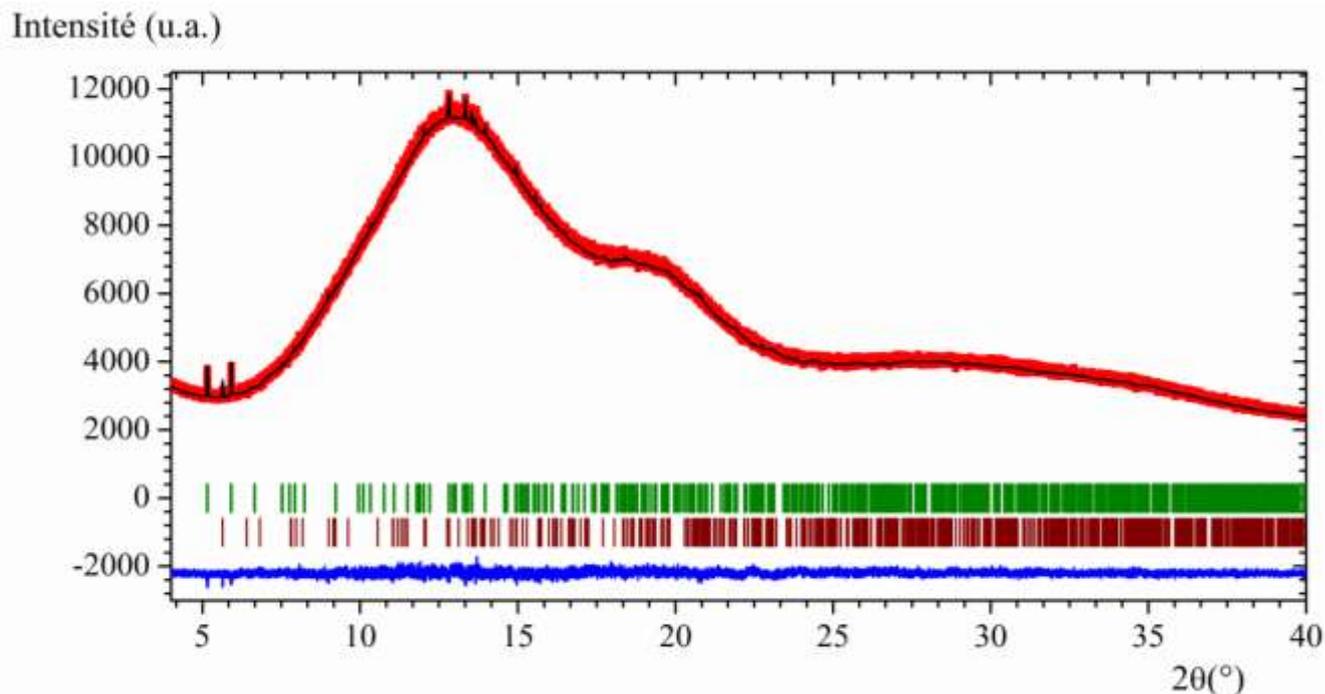


Figure V-5 : Diagramme de diffraction de RX issu de l'analyse de liquide synovial provenant d'un épanchement. Les données acquises sont représentées par des points rouges, le profil simulé par une ligne noire et la différence par une ligne bleue. Les barres verticales indiquent les positions des pics de Bragg pour la phase t-CPPD (haut) et m-CPPD (bas).

La diffraction des rayons X est donc une technique particulièrement adaptée pour suivre l'évolution des pyrophosphates de calcium hydratés en milieu biologique. Les échantillons analysés ne contiennent en effet que deux phases bien caractérisées, t-CPPD et m-CPPD, facilement discernables même avec un fond continu important. La quantité d'échantillon nécessaire reste cependant une limite, surtout dans le cas de l'étude de liquides synoviaux, et le développement de protocoles permettant de concentrer les cristaux est en cours.

A3. Analyse par spectroscopie Raman de calcifications issues de ménisques et de liquides synoviaux

L'analyse DRX a démontré la présence de cristaux dans certains des ménisques étudiés, posant la problématique de l'évolution de la phase m-CPPD *in vivo*. Elle est cependant limitée par la quantité minimale d'échantillon nécessaire pour cette analyse. La spectroscopie Raman couplée à l'observation au microscope optique a alors été utilisée afin d'identifier les différentes phases de CPP présentes. La spectroscopie Raman pourrait permettre d'identifier chacune des phases présentes, grâce aux signatures spectrales uniques pour chaque phase référencée (cf. Chapitre II) lors de l'étude *in vitro*. Si cette technique ne possède pas la statistique de comptage de la diffraction des rayons X, elle permet cependant d'analyser des quantités très faibles d'échantillon et d'identifier les phases présentes dont la phase l'amorphe. De plus la technique Raman peut être utilisée pour l'étude directe des liquides synoviaux et des ménisques, sans préparation préalable pouvant altérer les différentes phases

présentes, l'eau n'interférant pas dans le signal Raman.

A3 a) *Analyse des échantillons de ménisques*

La détection des microcristaux présents dans les ménisques et le liquide synovial par microscopie optique est peu précise, non spécifique et s'avère inefficace pour les cristaux de petite taille ($< 1 \mu\text{m}$). Il est ainsi difficile pour un observateur de détecter les cristaux contenus dans la matrice cartilagineuse des ménisques. L'expérience et l'utilisation de la microscopie polarisée peut faciliter la détection des gros cristaux au risque de ne détecter qu'une partie des cristaux présents [Omura *et al.*, 2010]. La détection et l'identification par spectroscopie Raman des cristaux se fait donc individuellement.

La figure V-6 présente l'identification d'un gros cristal contenu dans l'échantillon CHK2 MI2. Le cristal, mesurant plus de $10 \mu\text{m}$, a pu être détecté jusque dans la matrice cartilagineuse du ménisque en utilisant un microscope optique confocal. Le signal Raman obtenu permet l'identification sans ambiguïté de la phase t-CPPD par comparaison avec les spectres réalisés sur les cristaux synthétisés *in vitro*.

La matrice articulaire empêche cependant la détection de cristaux de petite taille. L'échantillon peut alors être analysé à travers une lamelle de verre afin de limiter son épaisseur. L'application d'une pression modérée sur la lamelle permet d'observer de nombreux cristaux se trouvant en périphérie de la matrice collagène ; ils peuvent ainsi être identifiés individuellement. Cette manipulation a permis l'observation de cristaux présentant une taille comprise entre 2 et $10 \mu\text{m}$ dans l'échantillon CHK2 MI2 (V-6). Tous ces cristaux ont été analysés comme étant des cristaux de t-CPPD (18 cristaux au total).

Les figures V-7 et V-8 présentent des cristaux issus de l'échantillon CHK10 ME. Des cristaux de faible taille ont pu être analysés par spectroscopie Raman après séparation de la matrice collagène. Les deux phases m-CPPD et t-CPPD ont été détectées. Les cristaux de grande taille ($> 3 \mu\text{m}$, 6 cristaux) correspondent à la phase m-CPPD, les cristaux de plus faible taille étant indistinctement les phases t-CPPD et m-CPPD (18 cristaux, soit 7 et 11 respectivement). Si ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs, ils sont en accord avec l'analyse par DRX. Les cristaux de m-CPPD de taille supérieure à $3 \mu\text{m}$ possèdent ainsi des largeurs plus grandes que ceux obtenus *in vitro*, pouvant expliquer la meilleure résolution observée par DRX (Figure V-2) sur la raie (110). De nombreuses formes aciculaires n'ont pu être analysées par spectroscopie Raman en raison de leur trop faible taille.

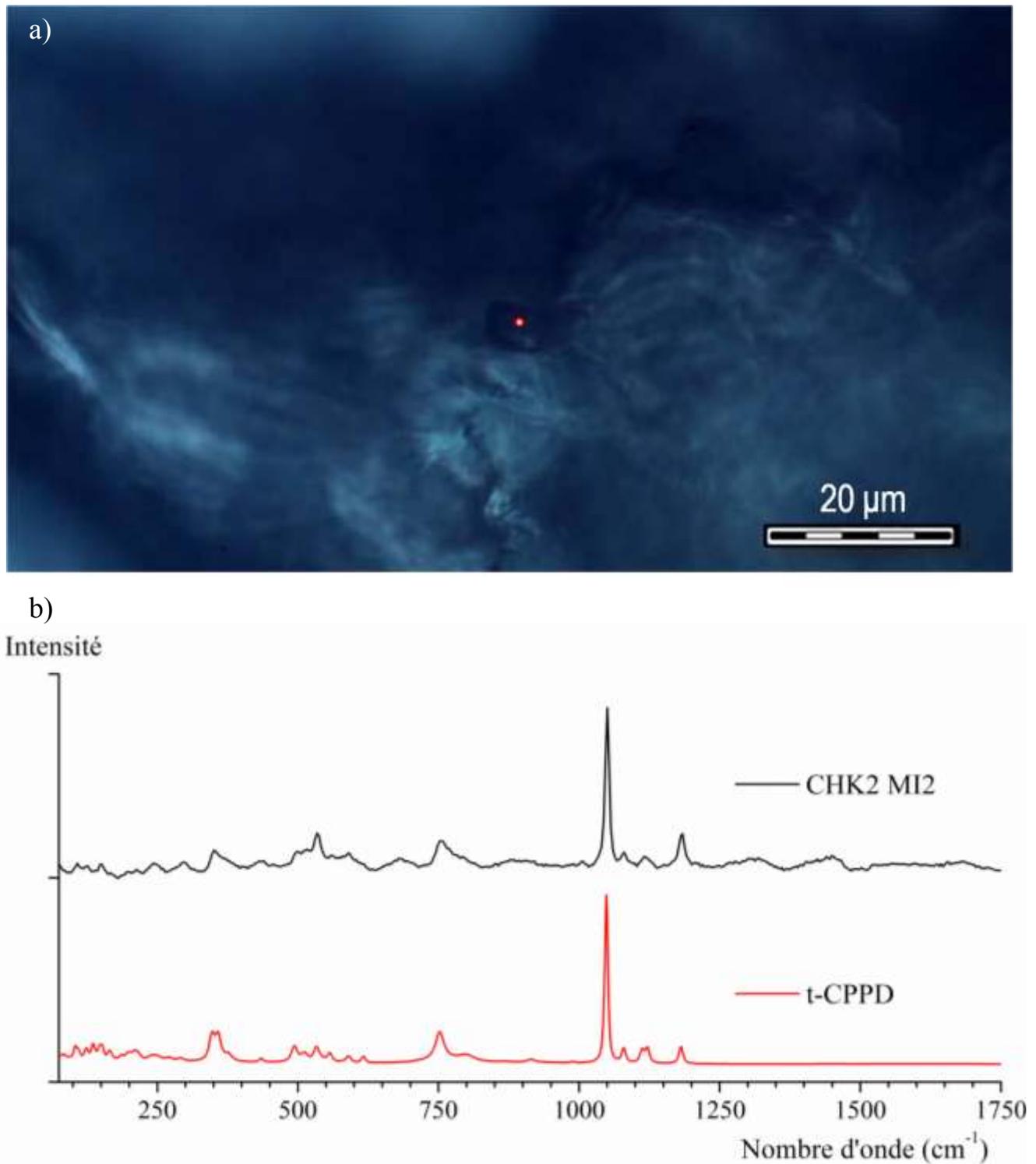


Figure V-6 : Image au microscope (a) et spectre Raman (b) d'un cristal de t-CPPD contenu dans l'échantillon CHK2 MI2. Le point rouge indique la position du laser lors de l'acquisition du spectre. La courbe noire présente le spectre du cristal analysé, la courbe rouge indique le spectre de la phase t-CPPD synthétisée *in vitro*.

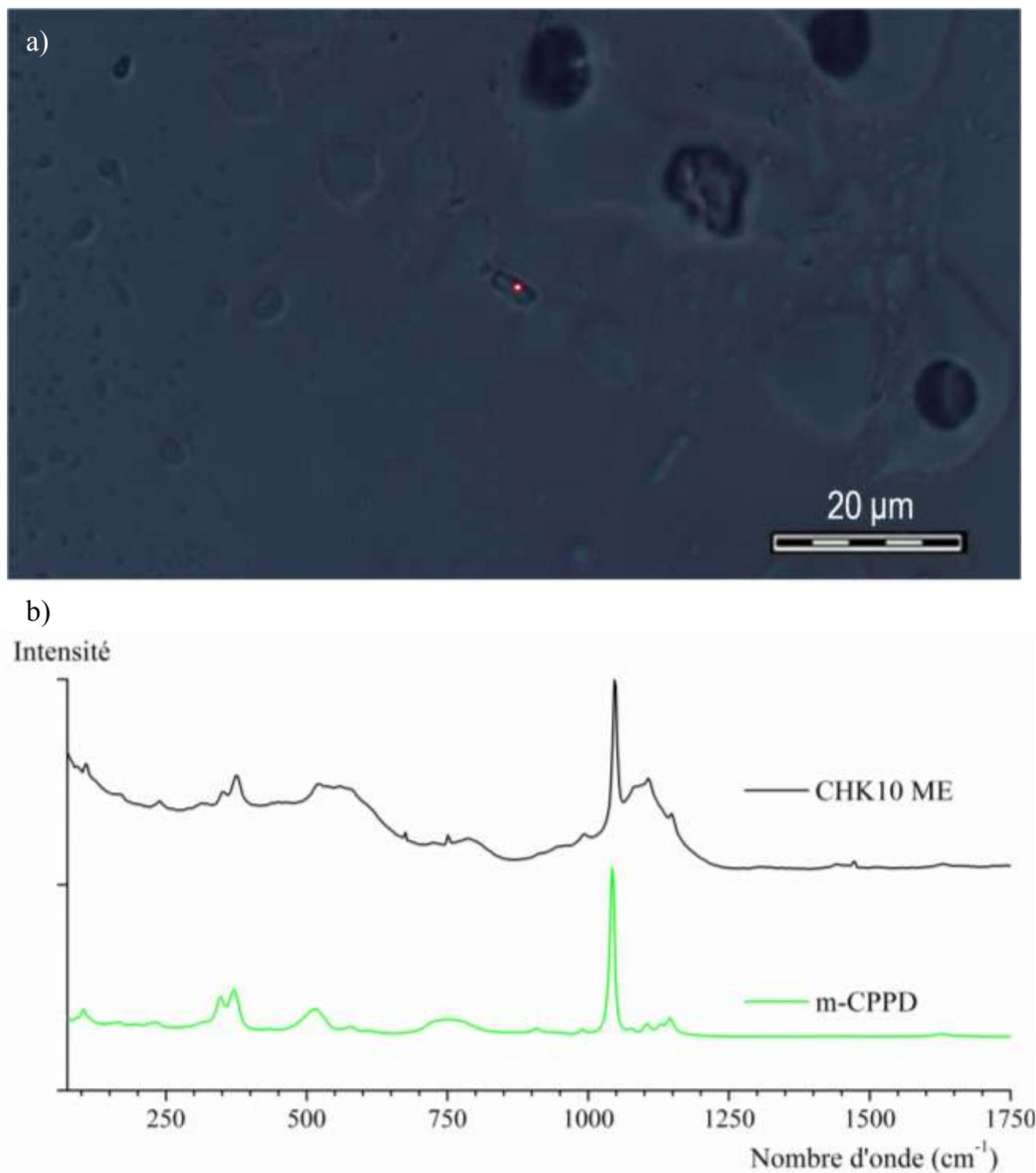


Figure V-7 : Image au microscope (a) et spectre Raman (b) d'un cristal de m-CPPD contenu dans l'échantillon CHK10 ME. Le point rouge indique la position du laser lors de l'acquisition du spectre. La courbe noire présente le spectre du cristal analysé, la courbe verte indique le spectre de la phase m-CPPD synthétisée *in vitro*.

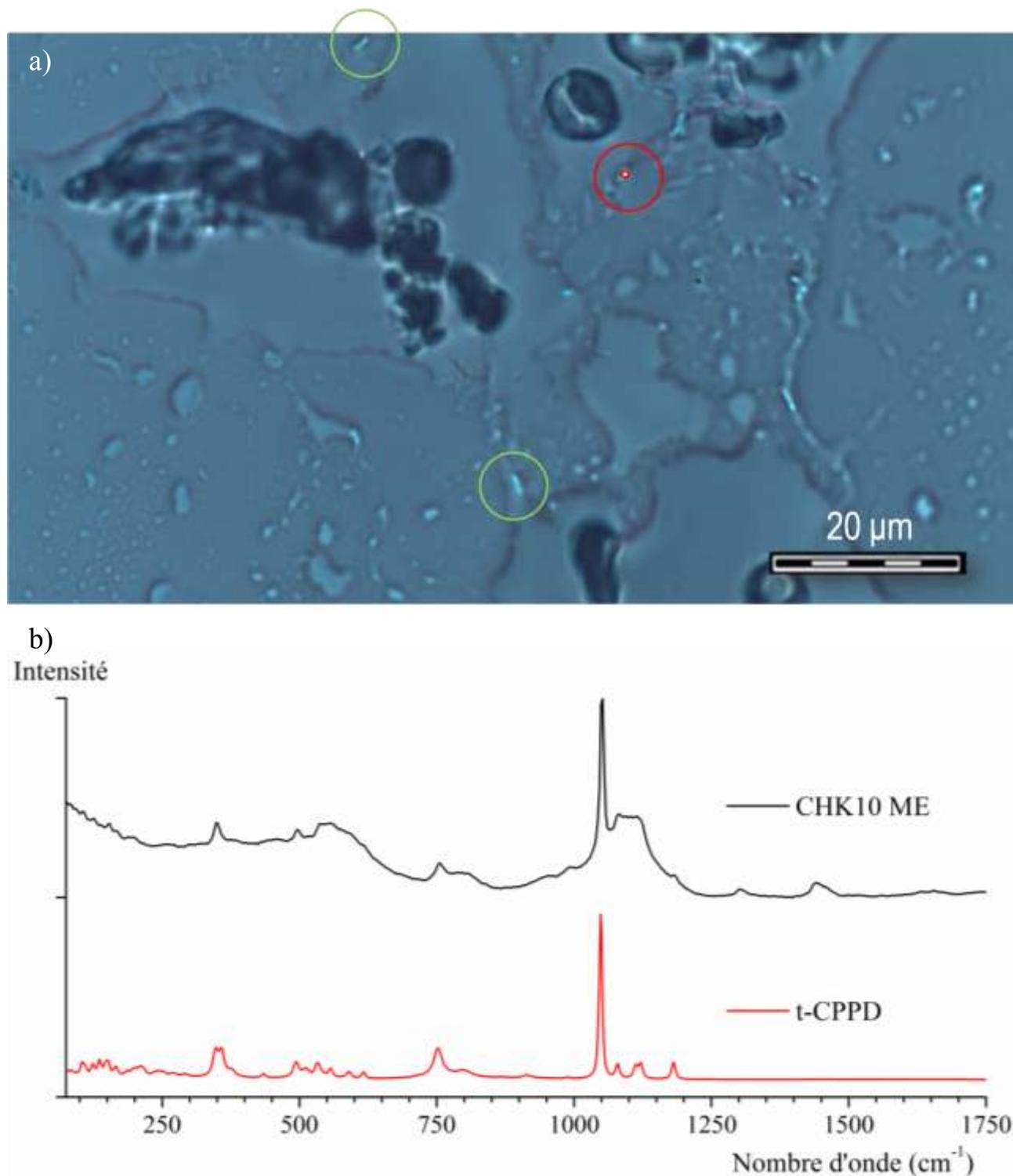


Figure V-8 : Image microscope (a) et spectre Raman (b) d'un cristal de t-CPPD contenu dans l'échantillon CHK10 ME. Le point rouge indique la position du laser lors de l'acquisition du spectre. Les cercles verts correspondent à d'autres cristaux de m-CPPD présents dans l'échantillon, le cercle rouge à un cristal de t-CPPD. La courbe noire présente le spectre du cristal analysé, la courbe rouge indique le spectre de la phase m-CPPD synthétisée *in vitro*.

Les cristaux de l'échantillon CHK10 ME semblent ainsi plus petits que ceux de l'échantillon CHK2 MI2, notamment les cristaux de la phase t-CPPD. Une étude par spectroscopie Raman sur l'ensemble des échantillons est en cours pour déterminer si ce résultat est confirmé sur un plus grand nombre d'échantillons.

Un fond continu est observable sur une majorité de spectres Raman, possédant un maximum d'intensité aux environs de 1100 cm^{-1} pouvant provenir de fonctions alcool présentes dans le milieu organique. Le signal ne semble cependant pas compatible avec de grandes quantités de phase amorphe a-CPP, visibles à 1045 cm^{-1} sur les spectres Raman des échantillons de a-CPP synthétisés *in vitro*.

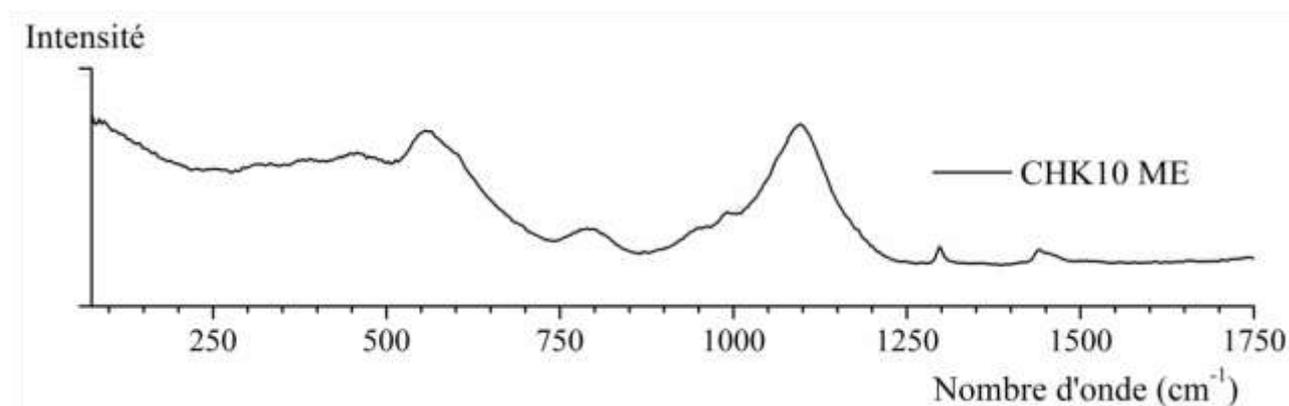


Figure V-9 : Spectre Raman de ménisque sans présence de cristaux; un fond continu est observé

A3 a) Analyse des échantillons de liquides synoviaux

Des cristaux de la phase t-CPPD ont pu être détectés dans le liquide synovial. Leur taille est relativement importante ($> 3\ \mu\text{m}$) et leur faciès est bien défini. La détection et l'identification de cristaux dans le liquide synovial est cependant dépendante de l'expérience de l'observateur, les cristaux étant de très faible taille et très dispersés.

Les analyses couplées de microscopie et spectroscopie Raman ont permis de détecter et d'identifier les cristaux contenus dans les échantillons de ménisques calcifiés et de liquides synoviaux. La présence de deux phases, m-CPPD et t-CPPD, a été confirmée. La taille et le faciès des cristaux ont pu être observés. Aucun signal de la phase amorphe a-CPP n'a pu être clairement établi sur les échantillons observés. Il n'est cependant pas établi si cela résulte d'un manque de sensibilité, de la difficulté à détecter des particules submicroniques ou de l'absence effective de phase a-CPP. La microscopie optique couplée à la spectroscopie Raman a cependant démontré son utilité comme outil potentiel de diagnostic médical. En effet, deux des réserves émises par Yavorsky *et al.*, au sujet de cette technique, à savoir des bibliothèques de spectres moins fournies et la nécessité de disposer d'un échantillon purifié (III-1), ont pu être écartées dans le cas des CPP en rassemblant les résultats des travaux présentés dans ce manuscrit de thèse [Yavorsky *et al.*, 2008].

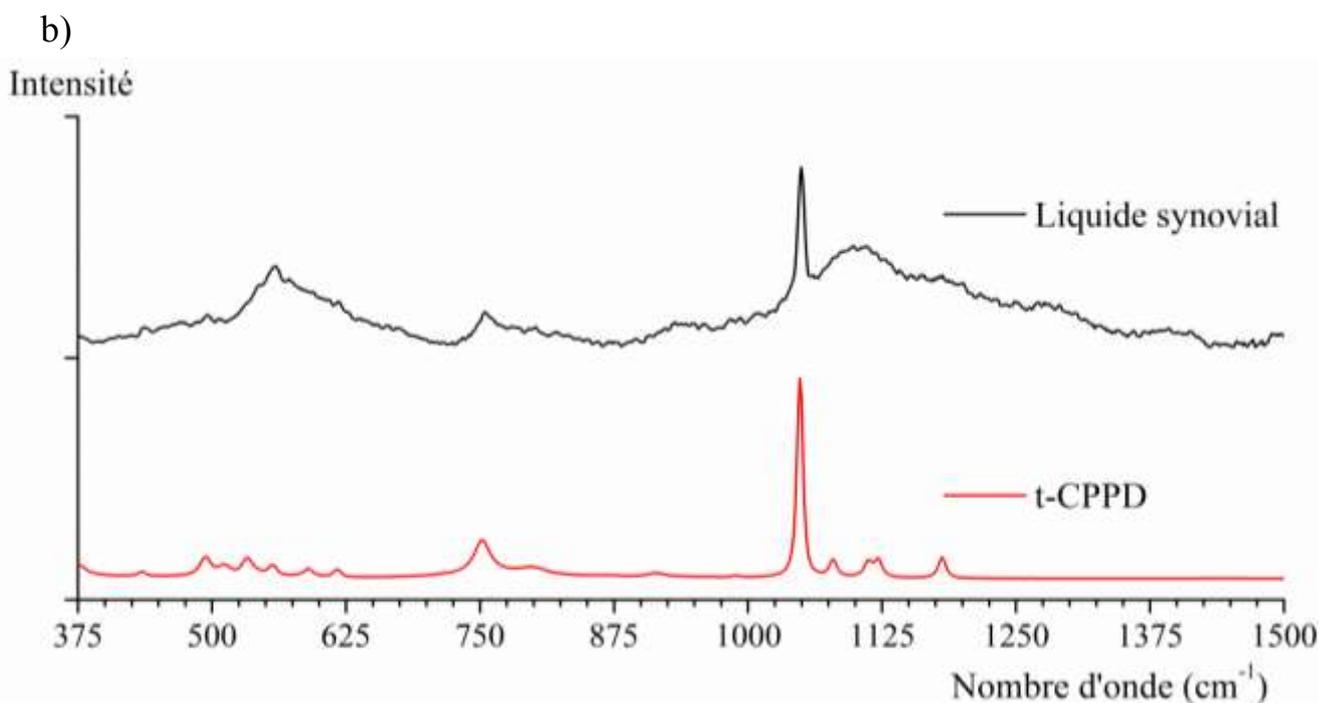
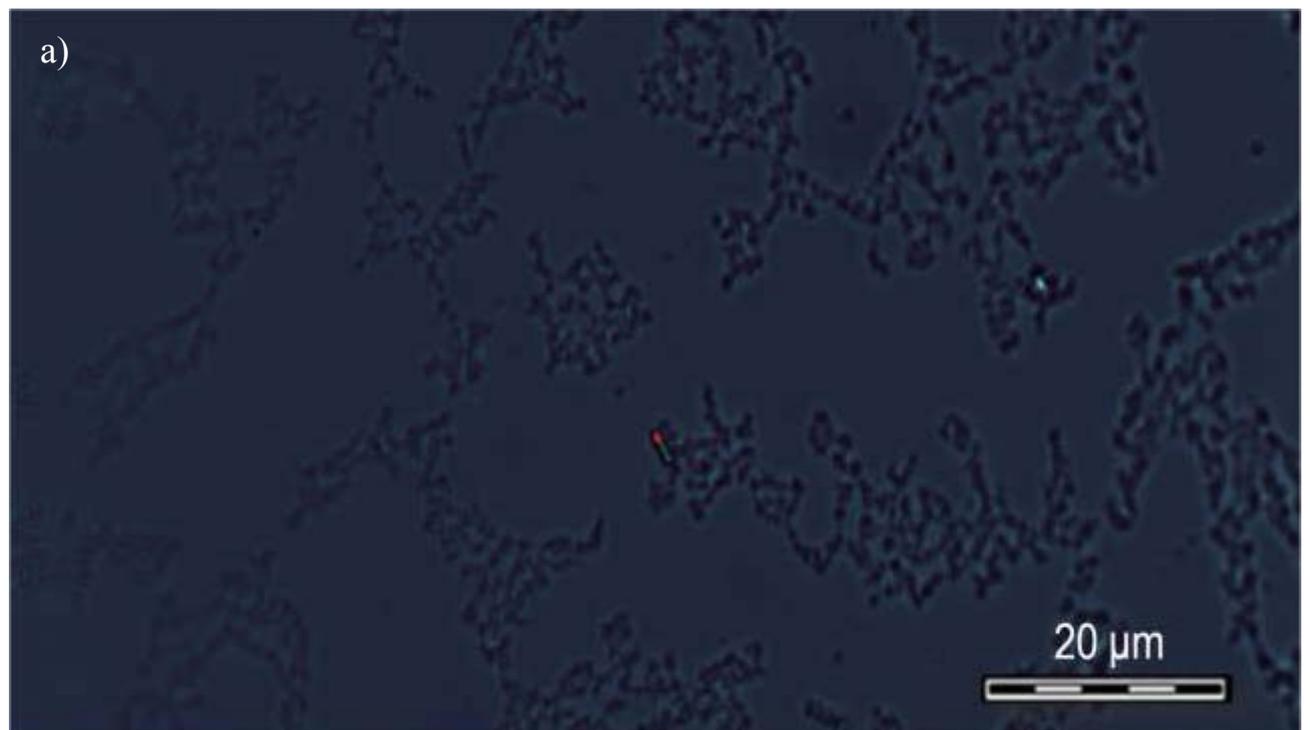


Figure V-10 : Image microscope (a) et spectre Raman (b) d'un cristal de t-CPPD contenu dans un échantillon de liquide synovial. Le point rouge indique la position du laser lors de l'acquisition du spectre. La courbe noire présente le spectre du cristal analysé, la courbe rouge indique le spectre de la phase t-CPPD synthétisée *in vitro*.

A4. Perspectives : Analyses complémentaires

Plusieurs analyses ont été envisagées pour caractériser les cristaux présents dans les ménisques et liquides synoviaux, telles que la microscopie électronique à balayage, couplée à la diffraction électronique, la spectroscopie XANES, de fluorescence ou encore la spectroscopie RMN. Ces techniques permettront de comparer la morphologie des cristaux biologiques, mais aussi leur environnement chimique, notamment les impuretés présentes (fer, magnésium, zinc,...) et les molécules adsorbées en surface. Ces analyses, prévues sur les spécimens caractérisés dans ce chapitre, permettront de mieux connaître les propriétés des cristaux synthétisés *in vivo*, par comparaison avec les résultats obtenus *in vitro*, et amélioreront potentiellement la compréhension de l'évolution et des interactions des phases de pyrophosphate de calcium hydratées *in vivo*.

B. Analyses des réactions inflammatoires : résultats préliminaires

Des tests biologiques *in vitro* permettant d'évaluer le potentiel inflammatoire des différentes phases de pyrophosphate de calcium hydratées ont été réalisés. Cette partie exposera quelques résultats préliminaires.

Ces études ont été réalisées en collaboration avec les docteurs Hang-Korng Ea, Laure Campillo-Gimenez et Frédéric Lioté du laboratoire Inserm U606 de l'Hôpital Lariboisière, Paris.

B1. Protocole expérimental

Des cellules de la lignée monocyttaire humaine THP-1 sont différenciées en macrophages par incubation dans une solution de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) à 0,5 μM . Les cellules sont ensuite mises en culture durant la nuit dans un milieu RPMI 1640, contenant un tampon phosphate et dépourvu de sérum de veau fœtal (SVF), en plaque 24 puits à raison de 300 000 cellules/500 μL . Les cellules deviennent alors adhérentes.

Le milieu est alors remplacé par une suspension contenant une phase de pyrophosphate de calcium hydratée (a-CPP, m-CPPD, t-CPPD) à une concentration de 200 $\mu\text{g/mL}$ et un volume total de 250 μL . Les cellules sont incubées dans ce milieu pour une durée de 2 h, 4 h ou 6 h.

A chaque temps, le surnageant de culture est récupéré et congelé à -20°C . Le marqueur d'inflammation, l'interleukine IL-1 β mature, est alors dosé dans le surnageant par un kit de dosage de type ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Toutes les manipulations ont été répétées 4 fois.

B2. Résultats préliminaires

Les résultats préliminaires présentés sur la figure V-11 indiquent que le potentiel inflammatoire de la phase m-CPPD est supérieur à celui de la phase t-CPPD. Il est intéressant de noter que la phase amorphe possède un potentiel inflammatoire nul après une incubation de 6 h. Ces premiers résultats sont cohérents avec la littérature ; des tests analogues mais sur des temps d'incubation plus longs vont être prochainement programmés afin de vérifier la stabilité ou les éventuelles évolutions des différentes phases en présence de cellules [Roch-Arveiller *et al.*, 1990; Swan *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2009].

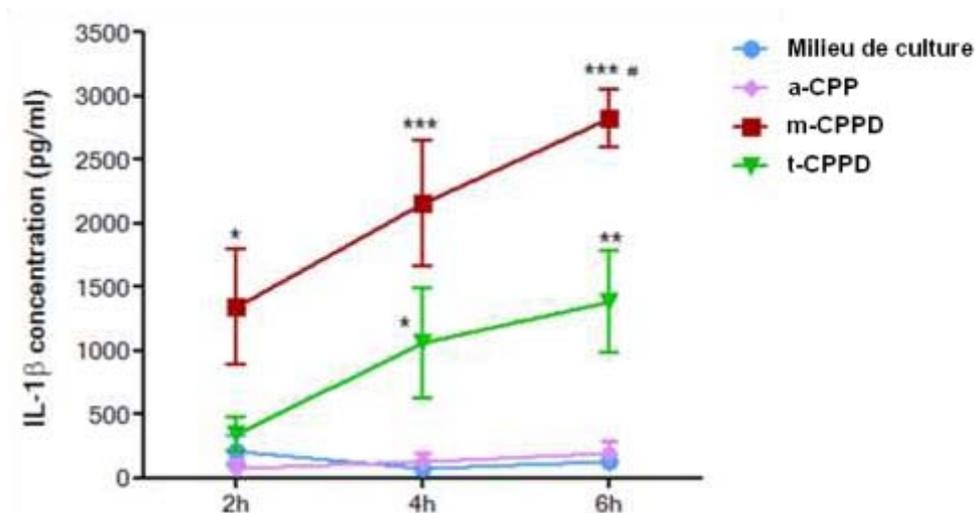


Figure V-11 : Suivi de la concentration d'interleukine IL-1 β lors de l'incubation en présence de différentes phases de CPP
 * $p < 0,05$ (m-CPPD ou t-CPPD vs MC ou a-CPP), *** $p < 0,001$ (m-CPPD ou t-CPPD vs MC ou a-CPP)
 # $p < 0,05$ (m-CPPD vs t-CPPD)

Des tests *in vivo*, utilisant des modèles murins, ont de plus été entrepris afin de mieux comprendre les mécanismes opérant en présence de cristaux pyrophosphate de calcium dihydraté. Les premiers résultats confirment les résultats *in vitro* avec une inflammation plus forte pour les phases cristallisées que pour la phase amorphe a-CPP.

Chacun de ces résultats biologiques pourra être analysé vis-à-vis des propriétés des cristaux, notamment de surface, en prenant en compte la surface spécifique, la taille, la morphologie. En effet la surface spécifique, de $1,3 \pm 0,3 \text{ m}^2/\text{g}$ pour t-CPPD, $5,0 \pm 0,5 \text{ m}^2/\text{g}$ pour m-CPPD et $25,7 \pm 0,5 \text{ m}^2/\text{g}$ pour a-CPP, pourrait ainsi relativiser la différence de potentiel inflammatoire de la phase m-CPPD par rapport à celui du t-CPPD en considérant la surface de contact des cristaux avec le milieu.

Ces différents tests permettront potentiellement de mieux comprendre le développement de cristaux *in vivo* et d'observer les différentes évolutions des phases de CPP. Les hypothèses sur la stabilité de la phase amorphe et sur l'évolution de la phase m-CPPD en t-CPPD *in vivo* pourront ainsi être évaluées.

C. Conclusions

Les analyses d'échantillons de ménisques et de liquides synoviaux ont démontré l'intérêt de l'utilisation de la diffraction des rayons X et de la micro-spectroscopie Raman pour la détection et l'identification des phases de pyrophosphate de calcium hydratées. D'autres techniques pourraient être testées afin de comparer les propriétés des cristaux biologiques par rapport aux cristaux synthétiques. Une hypothèse a de plus été formulée sur l'évolution de la phase m-CPPD en t-CPPD dans les ménisques.

Des résultats préliminaires d'étude des différents potentiels inflammatoires ont été présentés, indiquant une réaction inflammatoire plus forte avec les cristaux de m-CPPD. Ces résultats devront être plus finement examinés au regard des différents paramètres physico-chimiques des phases respectives, notamment concernant la surface des matériaux.

Conclusions générales et Perspectives

Ces travaux de recherche portaient sur le développement d'un protocole de synthèse fiable des différentes phases de pyrophosphate de calcium hydraté d'intérêt biologique et sur l'étude des propriétés physico-chimiques et structurales de ces composés. Ces différents aspects avaient pour objectif d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes de formation des cristaux observés *in vivo* et de procurer des éléments permettant d'améliorer le diagnostic des maladies liées à ces cristaux.

Dans cette optique, les principaux résultats et perspectives de cette thèse sont synthétisés ci-après.

Un protocole de synthèse de différentes phases de pyrophosphate de calcium hydraté a été mis au point. Ce protocole, simple, rapide et reproductible comparé aux méthodes précédemment publiées, aboutit à la formation de quatre phases pures de pyrophosphate de calcium : amorphe a-CPP, tétrahydratée m-CPPT β et dihydratées m-CPPD et t-CPPD. Les conditions de synthèse (température et pH) spécifiques à chaque phase ont été explorées afin de décrire complètement le système étudié. Des échantillons purs correspondant à chacune de ces phases ont été caractérisés, fournissant des données de référence pour l'identification de ces phases, notamment par diffraction des RX et techniques spectroscopiques. Ces résultats sont ainsi disponibles pour de futures études de cristaux pathologiques, incluant les caractérisations de la phase m-CPPD peu décrite dans la littérature.

Des études structurales complémentaires ont de plus été réalisées sur ces phases, associant diffraction des rayons X, diffraction des neutrons et modélisation *ab initio*. Les résultats obtenus ont permis la description de quatre structures de pyrophosphate de calcium hydraté, dont celle de la phase m-CPPD plus de 50 ans après sa première identification *in vivo*. Une analyse complète des signaux de spectroscopies Raman, infrarouge et RMN a pu ainsi être effectuée, aboutissant à la réattribution du spectre de vibration de la molécule de pyrophosphate. La comparaison entre la morphologie et la structure des différents cristaux a de plus permis la caractérisation de leurs propriétés de surface, ouvrant la voie pour de futures études établissant le lien entre chimie de surface, interaction avec le milieu *in vivo* et potentiel inflammatoire. Le but à moyen terme est d'identifier les mécanismes opérant à la surface des cristaux de pyrophosphate de calcium afin de limiter ou inhiber leur potentiel inflammatoire.

Les évolutions des phases de pyrophosphate ont ensuite été explorées, notamment les évolutions de la phase amorphe a-CPP et des déshydratations successives des phases cristallines hydratées. Les études d'évolution de la phase amorphe ont notamment confirmé sa très grande stabilité dans des conditions de pH et de température physiologiques. Ces résultats interrogent sur la présence

potentielle de la phase amorphe dans les articulations et sur les évolutions que pourrait subir celle-ci, pouvant conduire à la présence des cristaux de t-CPPD et m-CPPD observés *in vivo*. L'un des objectifs complémentaires de ces travaux, associant la synthèse de cristaux en phase gel, était d'obtenir des monocristaux de m-CPPD de taille et de qualité suffisantes pour l'analyse par diffraction des rayons X. Si des conditions favorables au développement de la phase m-CPPD ont pu être identifiées, les tentatives d'obtention de monocristaux sont restées infructueuses. L'obtention de ces cristaux pourrait cependant améliorer la description de cette phase, mais aussi de l'ensemble des mécanismes physico-chimiques impliquant la phase m-CPPD. Parallèlement, les évolutions des différentes phases CPP réalisées à haute température ont permis l'étude du phénomène d'hydrolyse de la molécule de pyrophosphate et la transition entre pyrophosphate de calcium monohydraté et phosphate de calcium dihydraté (brushite). La compréhension de phénomènes similaires observés par exemple dans la fabrication de verre par fusion ou de dépôt de pyrophosphate de calcium, pourrait s'appuyer sur le modèle de conversion totale pyrophosphate/orthophosphate décrit dans le cadre des présents travaux.

Des résultats biologiques préliminaires ont finalement été présentés, par l'analyse de cristaux de pyrophosphate de calcium présents dans les ménisques et le liquide synovial de patients arthritiques. Sur la base de ces résultats préliminaires, il apparaît que la phase m-CPPD soit présente dans les articulations faiblement calcifiées, avec une concentration relativement stable d'un patient à l'autre, alors que la quantité de cristaux de t-CPPD augmente avec le taux de calcification des ménisques étudiés. Cette observation serait cohérente avec l'évolution de la phase m-CPPD vers t-CPPD observée *in vitro*. Une étude sur un plus large panel de spécimens biologiques, composé de différents tissus de l'articulation, pourrait permettre la validation de cette hypothèse. Aucune trace de phase amorphe n'a été observée dans les échantillons arthritiques analysés. La question de la présence de phase amorphe initialement, avant dégradation de l'articulation, de sa stabilité dans un milieu arthrosique ou de son évolution durant la progression de la maladie reste cependant à être élucidée. Complémentairement, l'évaluation du potentiel inflammatoire de cristaux synthétiques, décrit précédemment, est en cours. L'analyse physico-chimique et biologique couplée pourrait apporter des informations complémentaires sur l'action inflammatoire des pyrophosphates de calcium, la stabilité de la phase amorphe *in vivo* pouvant par exemple être testée directement. Le but à court terme est de découpler les effets dus à la phase étudiée, à la morphologie des cristaux ou à l'évolution des différentes phases.

Ainsi les études présentées ici ont permis la description des cristaux de pyrophosphates de calcium et leur évolution principalement *in vitro*, dans des conditions définies. Une grande partie des

perspectives de ce travail consiste à l'étude des mécanismes de nucléation, de croissance et de la solubilité de ces phases. Les effets de différents additifs sur ces processus devront être évalués afin, à moyen terme, de ralentir voire inhiber la formation de cristaux *in vivo* et/ou de favoriser leur dissolution dans les cas d'arthrose déclarée. Le but à long terme étant la mise au point de traitements pouvant enrayer le cercle vicieux lié aux micro-calcifications dans la dégradation de l'articulation.

La richesse des collaborations inter- et pluridisciplinaires développées autour de ce sujet a permis de nombreuses avancées sur la compréhension de la physico-chimie des pyrophosphates de calcium hydraté et de leur formation et évolution *in vitro* et *in vivo*, mais de nombreuses étapes restent à franchir afin de pouvoir diagnostiquer le plus précocement possible et traiter plus efficacement ces microcalcifications pathologiques.

Bibliographie

- Addison, W. N., Azari, F., Sørensen, S., Kaartinen, M. T. & Marc, D. (2007). *J. Biol. Chem.* **282**, 15872–15883.
- Baer, W. (1847). *Pogg. Ann.* **75**, 152–158.
- Le Bail, A. (2004). *Powder Diffr.* **19**, 249–254.
- Le Bail, A., Duroy, H. & Fourquet, J. L. (1988). *Mat. Res. Bull.* **23**, 447–452.
- Balan, E., Saitta, A. M., Mauri, F. & Calas, G. (2001). *Am. Mineral.* **86**, 1321–1330.
- Balić-Žunić, T., Christoffersen, M. R. & Christoffersen, J. (2000). *Acta Crystallogr.* **B56**, 953–958.
- Bassett, H., Bedwell, W. L. & Hutchinson, J. B. (1936). *J. Chem. Soc.* **1936**, 1412–1429.
- Birkholz, M. (2006). *Thin Film Analysis by X-Ray Scattering* Weinheim: Wiley-VCH.
- Bish, D. L. & Howard, S. A. (1988). *J. Appl. Crystallogr.* **21**, 86–91.
- Blair, J. M., Sorensen, L. B., Arnsdorf, M. F. & Lai, R. (1995). *Semin. Arthritis Rheum.* **24**, 359–369.
- Boultif, A. & Louër, D. (2004). *J. Appl. Cryst.* **37**, 724–731.
- Brown, E. H., Lehr, J. R., Smith, J. P. & Frazier, A. W. (1963). *Agric. Food Chem.* **11**, 214–222.
- Brown, I. D. & Calvo, C. (1970). *J. Solid State Chem.* **1**, 173–179.
- Caglioti, G., Paoletti, A. & Ricci, F. P. (1958). *Nucl. Instruments.* **3**, 223–228.
- Calvo, C. (1968). *Inflamm. Res.* **47**, 1345–1351.
- Calvo, C. & Au, P. K. L. (1969). *Can. J. Chem.* **47**, 3409–3416.
- Cambridge Structural Database (2014). *CSD Sp. Gr. Stat. – Sp. Gr. Freq. Ordering Sp.*
- Capitelli, F., Harcharras, M., Assaaoudi, H., Ennaciri, A., Moliterni, A. G. G. & Bertolasi, V. (2003). *Z. Krist.* **218**, 345–350.
- Charlot, G. (1974). *Chimie Analytique Quantitative*, Masson, Paris.
- Chateigner, D. (2010). *Combined analysis: structure-texture-microstructure-phase-stresses-reflectivity analysis by x-ray and neutron scattering* <http://www.ecole.ensicaen.fr/~chateign/texture/combined.pdf>, ISBN : 978-1-84821-198-8.
- Cheng, P.-T. & Pritzker, K. P. H. (1980). *J. Rheumatol.* **8**, 772–782.

- Cheng, P.-T. & Pritzker, K. P. H. (1981). *J. Rheumatol.* **8**, 772–782.
- Cheng, P.-T. & Pritzker, K. P. H. (1983). *J. Rheumatol.* **10**, 769–777.
- Cheng, P.-T., Pritzker, K. P. H., Adams, M. E., Nyburg, S. C. & Omar, S. A. (1980). *J. Rheumatol.* **7**, 609–616.
- Christoffersen, M. R., Balić-Žunić, T. & Christoffersen, J. (2002). *Cryst. Growth Des.* **2**, 567–571.
- Christoffersen, M. R., Balić-Žunić, T., Pehrson, S. & Christoffersen, J. (2000). *J. Cryst. Growth.* **212**, 500–506.
- Christoffersen, M. R., Balić-Žunić, T., Pehrson, S. & Christoffersen, J. (2001). *Cryst. Growth Des.* **1**, 463–466.
- Christoffersen, M. R. & Christoffersen, J. (2003). *Cryst. Growth Des.* **3**, 79–82.
- Christoffersen, M. R., Seierby, N., Balić-Žunić, T. & Christoffersen, J. (1999). *J. Cryst. Growth.* **203**, 234–243.
- Clark, T. (1827a). *Edinbg. J. Sci.* **7**, 311–314.
- Clark, T. (1827b). *Edinbg. J. Sci.* **7**, 309–311.
- Clark, T. (1827c). *Edinbg. J. Sci.* **7**, 296–309.
- Coelho, A. A. (2003). *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 86–95.
- Coelho, A. A. (2009). *TOPAS-Academic*. Version 4.2. Coelho Software, Brisbane, Australia.
- Cornilsen, B. C. (1984). *J. Mol. Struct.* **117**, 1–9.
- Cruikshank, D. W. J. (1961). *J. Chem. Soc.* 5486–5504.
- Davis, N. L., Mandel, G. S., Mandel, N. S. & Dickerson, R. E. (1985). *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.* **15**, 513–521.
- Decision Resources Inc. (2004). *Osteoarthritis: Immune and Inflammatory Disorders Study*, Decision Resources Inc., edited by, Waltham, Massachusetts.
- Delley, B. (2006). *Mol. Simul.* **32**, 117–123.
- Dijkgraaf, L. C., Liem, R. S. B., de Bont, L. G. M. & Boering, G. (1995). *Osteoarthr. Cartil.* **3**, 35–45.
- Dollase, W. A. (1986). *Appl. Crystallogr.* **19**, 207–272.

- Dosen, A. & Giese, R. F. (2011). *Am. Mineral.* **96**, 368–373.
- Ea, H.-K., Nguyen, C., Bazin, D., Bianchi, A., Guicheux, J., Reboul, P., Daudon, M. & Lioté, F. (2011). *Arthritis Rheum.* **63**, 10–18.
- Effenberger, H. & Pertlik, F. (1993). *Monatshefte Für Chemie.* **124**, 381–389.
- Eliseo, P. & Vega, J. (2005). *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **19**, 371–386.
- Farrow, C. L., Juhas, P., Liu, J. W., Bryndin, D., Božin, E. S., Bloch, J., Proffen, T. & Billinge, S. J. L. (2007). *J. Phys. Condens. Matter.* **19**, 335219.
- Felson, D. T. & Neogi, T. (2004). *Arthritis Rheum.* **50**, 341–344.
- Fuerst, M., Bertrand, J., Lammers, L., Dreier, R., Echtermeyer, F., Nitschke, Y., Rutsch, F., Schäfer, F. K. W., Niggemeyer, O., Steinhagen, J., *et al.* (2009). *Arthritis Rheum.* **60**, 2694–2703.
- Fuerst, M., Lammers, L., Schäfer, F. K. W., Niggemeyer, O., Steinhagen, J., Lohmann, C. H. & Rüther, W. (2010). *Rheumatol. Int.* **30**, 623–631.
- Gervais, C., Laurencin, D., Wong, A., Pourpoint, F., Labram, J., Woodward, B., Howes, A. P., Pike, K. J., Dupree, R., Mauri, F., *et al.* (2008). *Chem. Phys. Lett.* **464**, 42–48.
- Giesber III, H. G., Korzenski, M. B., Pennington, W. T. & Kolis, J. W. (2000). *Acta Crystallogr. C.* **56**, 399–400.
- Gránásy, L., Pusztai, T., Tegze, G., Warren, J. & Douglas, J. (2005). *Phys. Rev. E.* **72**, 011605.
- Gras, P., Rey, C., Marsan, O., Sarda, S. & Combes, C. (2013a). *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 5886–5895.
- Gras, P., Teychené, S., Rey, C., Charvillat, C., Biscans, B., Sarda, S. & Combes, C. (2013b). *CrystEngComm.* **15**, 2294–2300.
- Grimme, S. (2006). *J. Comput. Chem.* **27**, 1787–1799.
- Grover, L. M., Wright, A. J., Gbureck, U., Bolarinwa, A., Song, J., Liu, Y., Farrar, D. F., Howling, G., Rose, J. & Barralet, J. E. (2013). *Biomaterials.* **34**, 6631–6637.
- Groves, P. J., Wilson, R. M., Dieppe, P. A. & Shellis, R. P. (2007). *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**, 1355–1360.
- Haidinger, W. (1827). *Edinbg. J. Sci.* **7**, 314–316.
- Hohenberg, P. & Kohn, W. (1964). *Phys. Rev. B.* **136**, 864–871.

- Hong, J., Yoshida, N., Chong, S., Lee, C., Ham, S. & Hirata, F. (2012). *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 2239–2246.
- Ivorra, J., Rosas, J. & Eliseo, P. (1999). *Ann. Rheum. Dis.* **58**, 582–584.
- Jackson, K. A. (2005). *Kinetic Processes: Crystal Growth, Diffusion, and Phase Transitions in Materials*, pp. 283–310. Weinheim: Wiley-VCH.
- Jeffrey, G. A. (1997). *An Introduction to Hydrogen Bonding*, pp. 11–16. New York: Oxford University Press, Inc.
- Joe, I. H., Aruldas, G. & Keresztury, G. (1991). *J. Raman Spectrosc.* **22**, 537–539.
- Kara, M. & Kurki-Suonio, K. (1981). *Acta Crystallogr.* **A37**, 201–210.
- Kohn, N. N., Hughes, R. E., McCarty, D. J. & Faires, J. S. (1962). *Ann. Intern. Med.* **56**, 738–745.
- Kongshaug, K. O., Fjellva, H. & Lillerud, K. P. (2000). *Solid State Sci.* **2**, 205–214.
- Langford, J. I. (2000). *Industrial Application of X-Ray Diffraction*, F.H. Chung, & D.K. Smith, edited by, pp. 751–775. New York: Marcel Dekker Inc.
- Lazarev, A. N. (1972). *Vibrational Spectra and Structure of Silicates*, Consultants Bureau, New York, English Translation.
- Lecante, P., Mosset, A. & Galy, J. (1985). *J. Appl. Cryst.* **18**, 214–218.
- Levy, M. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 6062–6065.
- Lieske, J. C., Leonard, R., Swift, H. & Toback, F. G. (1996a). *Am. J. Physiol.* **270**, F192–199.
- Lieske, J. C., Norris, R. & Toback, F. G. (1997). *Am. J. Physiol.* **273**, F224–233.
- Lieske, J. C., Toback, F. G. & Deganello, S. (1996b). *Calcif. Tissue Int.* **58**, 195–200.
- Liu, Y. Z., Jackson, A. P. & Cosgrove, S. D. (2009). *Osteoarthr. Cartil.* **17**, 1333–1340.
- Lynch, A. M., Dunican, K. C. & Seed, S. M. (2009). *Formulary.* **44**, 143–151.
- Mackenzie, N. C. W., Huesa, C., Rutsch, F. & MacRae, V. E. (2012). *Bone.* **51**, 961–968.
- MacMullan, P., McMahon, G. & McCarthy, G. (2011). *Jt. Bone Spine.* **78**, 358–363.
- Mandel, G. S., Renne, K. M., Kolbach, A. M., Kaplan, W. D., Miller, J. D. & Mandel, N. S. (1988). *J. Cryst. Growth.* **87**, 453–462.
- Mandel, N. S. (1975). *Acta Crystallogr.* **B31**, 1730–1734.

- Mandel, N. S. (1976). *Arthritis Rheum.* **19**, 439–445.
- Mandel, N. S., Mandel, G. S., Carroll, D. J. & Halverson, P. B. (1984). *Arthritis Rheum.* **27**, 789–796.
- March, A. (1932). *Z. Krist.* **81**, 285–297.
- Massiot, D., Fayon, F., Montouillout, V., Pellerin, N., Hiet, J., Roiland, C., Florian, P., Coutures, J.-P., Cormier, L. & Neuville, D. R. (2008). *J. Non. Cryst. Solids.* **354**, 249–254.
- Mathew, M. & Ammon, H. L. (1995). *J. Chem. Crystallogr.* **25**, 219–222.
- McCarty, D. J. (1983). *Ann. Rheum. Dis.* **42**, 243–253.
- McCarty, D. J., Hogan, J. M., Gatter, R. A. & Grossman, M. (1966). *J. Bone Jt. Surg.* **48-A**, 309–325.
- McCarty, D. J., Kohn, N. N. & Faires, J. S. (1962). *Ann. Intern. Med.* **56**, 711–737.
- McCusker, L. B., Dreele, R. B. Von, Cox, D. E., Louër, D. & Scardi, P. (1999). *J. Appl. Cryst.* **32**, 36–50.
- Momma, K. & Izumi, F. (2011). *J. Appl. Cryst.* **44**, 1272–1276.
- Monkhorst, H. J. & Pack, J. P. (1976). *Phys. Rev. B.* **13**, 5188–5192.
- Nguyen, C., Ea, H.-K., Thiaudiere, D., Reguer, S., Hannouche, D., Daudon, M., Lioté, F. & Bazin, D. (2011). *J. Synchrotron Radiat.* **18**, 475–480.
- Oka, J. & Kawahara, a. (1982). *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **38**, 3–5.
- De Oliveira, C. I. R., de Oliveira, L. F. C., Dias Filho, F. a, Messaddeq, Y. & Ribeiro, S. J. L. (2005). *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **61**, 2023–2028.
- Omura, Y., Okamoto, R., Konno, M. & Shiro, M. (2010). *Micron.* **41**, 974–982.
- Parekh, B., Parikh, K. & Joshi, M. (2013). **1304**, 1304–1306.
- Parr, R. G. & Yang, W. (1989). *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, p. 333. New York: Oxford University Press.
- Paschalakis, P., Vynios, D. H., Tsiganos, C. P., Dalas, E., Maniatis, C. & Koutsoukos, P. G. (1993). *Biochim. Biophys. Acta (G). Gen. Subj.* **1158**, 129–136.
- Paschalakis, P., Vynios, D. H., Tsiganos, C. P. & Koutsoukos, P. G. (2002). *Water Soluble Polymers, Solutions Properties and Applications*, Z. Amjad, edited by, pp. 63–75. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Pavlov, M., Siegbahn, P. E. M. & Sandstro, M. (1998). *J. Phys. Chem. A.* **5639**, 219–228.

- Pawley, G. W. (1981). *J. Appl. Cryst.* **14**, 357–361.
- Perdew, J. P., Burke, K. & Ernzerhof, M. (1996). *Phys. Rev. Lett.* **77**, 3865–3868.
- Petricek, V., Dusek, M. & Palatinus, L. (2006). Jana2006. The crystallographic computing system. Institute of Physics, Praha, Czech Republic.
- Popa, N. C. (1998). *J. Appl. Cryst.* **31**, 176–180.
- Pritzker, K. P. H. (1998). *Calcium Phosphate in Biological and Industrial Systems*, Z. Amjad, edited by, pp. 277–301. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Pritzker, K. P. H., Cheng, P.-T., Adams, M. E. & Nyburg, S. C. (1978). *J. Rheumatol.* **5**, 469–473.
- Rietveld, H. W. (1969). *J. Appl. Cryst.* **2**, 65–71.
- Riihimäki, H. & Viikari-Juntura, E. (2000). *Encyclopédie de Sécurité et de Santé Au Travail*, J.M. Stellman, edited by, pp. 6.1–6.38. Genève: Bureau International du Travail.
- Roch-Arveiller, M., Legros, R., Chanaud, B., Muntaner, O., Strzalko, S., Thuret, A., Willoughby, D. A. & Giroud, J. P. (1990). *Biomed & Pharmacother.* **44**, 467–474.
- Rodríguez-Carvajal, J. (2001). *Comm. Powder Diffr. (IUCr). Newsl.* **26**, 12–19.
- Roiland, C., Fayon, F., Simon, P. & Massiot, D. (2011). *J. Non. Cryst. Solids.* **357**, 1636–1646.
- Roisnel, T. & Rodríguez-Carvajal, J. (2000). *Proc. Seventh Eur. Powder Diffr. Conf. (EPDIC 7)*. 118–123.
- Rosenthal, A. K., Mattson, E., Gohr, C. M. & Hirschmugl, C. J. (2008). *Osteoarthr. Cartil.* **16**, 1395–1402.
- Rulmont, A., Cahay, R., Liegeois-Duyckaerts, M. & Tarte, P. (1991). *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.* **28**, 207–219.
- Ryan, L. M. & McCarty, D. J. (1995). *Ann. Rheum. Dis.* **54**, 939–941.
- Scarlett, N. V. Y. & Madsen, I. C. (2006). *Powder Diffr.* **21**, 278–284.
- Scherrer, P. (1918). *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen.* **26**, 98–100.
- Schneider, S. & Collin, R. L. (1973). *Inorg. Chem.* **12**, 2136–2139.
- Schumacher, H. R., Fishbein, P., Phelps, P., Tse, R. & Krauser, R. (1975). *Arthritis Rheum.* **18**, 783–792.
- Shannon, R. D. (1976). *Acta Crystallogr.* **A23**, 751–761.

- Shannon, R. D. & Prewitt, C. T. (1969). *Acta Crystallogr.* **B25**, 925–946.
- Sinyaev, V. a., Le Geros, R. Z., Levchenko, L. V., Shustikova, E. S. & Karzhaubaeva, R. a. (2008). *Russ. J. Gen. Chem.* **78**, 864–867.
- Sinyaev, V. A., Shustikova, E. S., Levchenko, L. V & Sedunov, A. A. (2001). *Inorg. Mater.* **37**, 735–738.
- Slater, C., Laurencin, D., Burnell, V., Smith, M. E., Grover, L. M., Hriljac, J. A. & Wright, A. J. (2011). *J. Mater. Chem.* **21**, 18783–18791.
- Snyder, R. L. (1999). *X-Ray Characterization of Materials*, E. Lifshin, edited by, pp. 1–103. Weinheim: Wiley-VCH.
- Sonneveld, E. J. & Visser, J. W. (1975). *J. Appl. Cryst.* **8**, 1–7.
- Stephens, P. W. (1999). *J. Appl. Cryst.* **32**, 281–289.
- Stockbridge, R. B. & Wolfenden, R. (2011). *J. Biol. Chem.* **286**, 18538–18546.
- Stokes, A. R. & Wilson, A. J. C. (1942). *Math. Proc. Cambridge Philos. Soc.* **38**, 313–322.
- Swan, A., Heywood, B., Chapman, B., Seward, H. & Dieppe, P. (1995). *Ann. Rheum. Dis.* **54**, 825–830.
- Terkeltaub, R. A. (1997). *Arthritis and Allied Conditions*, W.J. Koopman, & L.W. Moreland, edited by, pp. 2357–2372. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Thompson, P., Cox, D. E. & Hastings, J. B. (1987). *J. Appl. Cryst.* **20**, 79–83.
- Toraya, H. (1986). *J. Appl. Cryst.* **19**, 440–447.
- Villa-Bellosta, R., Wang, X., Millán, J. L., Dubyak, G. R. & O’Neill, W. C. (2011). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, H61–8.
- Van Wazer, J. R. & Callis, C. F. (1958). *Chem. Rev.* 1011–1046.
- Webb, N. C. (1966). *Acta Crystallogr.* **21**, 942–948.
- Wieland, H. A., Michaelis, M., Kirschbaum, B. J. & Rudolphi, K. A. (2005). *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 331–344.
- Wierzbicki, A. & Cheung, H. S. (1998). *J. Mol. Struct.* **454**, 287–297.
- Wierzbicki, A., Dalal, P., Madura, J. D. & Cheung, H. S. (2003). *J. Phys. Chem.* **107**, 12346–12351.
- Williamson, G. K. & Hall, W. H. (1953). *Acta Metall.* **1**, 22–31.

Winternitz, C. I., Jackson, J. K. & Burt, H. M. (1996). *Rheumatol. Int.* **16**, 101–107.

Wulff, G. (1901). *Z. Krist. Miner.* **34**, 449–530.

Yan, X., Cruz, T., Cheng, P.-T. & Pritzker, K. P. H. (1991). *J. Rheumatol.* **18**, 66–71.

Yavorsky, A., Hernandez-Santana, A., McCarthy, G. & McMahon, G. (2008). *Analyst.* **133**, 302–318.

Zhang, W., Doherty, M., Pascual, E., Barskova, V., Guerne, P., Jansen, T. L., Leeb, B. F., Pimentao, J., Punzi, L., Richette, P., *et al.* (2011). 14–19.

Annexes

A. Techniques de caractérisation

A1. Diffraction

Diffraction des rayons X

Les mesures de diffraction des rayons X (DRX) sur poudre ont été effectuées à l'aide d'un diffractomètre Brüker D8 Advance et sur la ligne Cristal du synchrotron Soleil. La description complète des appareils est détaillée dans l'annexe Chapitre VIB.

Diffraction des neutrons

Les mesures de diffraction des neutrons ont été réalisées sur le diffractomètre PYRRHIAS ligne G4-1 réacteur Orphée LLB (annexe Chapitre VIB).

A2. Spectroscopie

Spectroscopie vibrationnelle Infrarouge (FTIR)

Les analyses FTIR ont été réalisées avec un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (ThermoElectron modèle Nicolet 5700). La gamme spectrale acquise est comprise entre 4000 et 400 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} et une accumulation de 64 scans. Les échantillons ont été broyés dans un mortier en agate puis mélangé au bromure de potassium KBr en proportion : 2 mg d'échantillon pour 300 mg de matrice KBr. Une pastille a ensuite été réalisée par pressage uniaxial avec une pression de 8 tonnes.

Spectroscopie vibrationnelle Raman

Les acquisitions de spectre Raman ont été réalisées à l'aide d'un microspectroscopie confocal Horiba Jobin Yvon Labram HR800 équipé d'une diode laser Ar ($\lambda = 532 \text{ nm}$) sur un domaine spectral s'étendant de 50 à 4000 cm^{-1} avec un temps d'acquisition de 10 secondes et 5 accumulations pour les phases cristallines ou bien de 15 secondes et 12 accumulations pour la phase amorphe. Le montage optique est composé d'un réseau de 600 traits/mm, d'un objectif x100, d'un diaphragme 100 μm sans utilisation de filtre.

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ^{31}P ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance III 700 MHz SB à la fréquence de 160 MHz. Les échantillons ont été placés dans un rotor de 2,5 mm auquel a été

appliquée une rotation à l'angle magique (MAS) de 30 kHz. Le nombre de scans est fixé à 16 pour les phases cristallines et 56 pour la phase amorphe. Le délai de recyclage est de 15 secondes.

Les spectres RMN ^{43}Ca ont été réalisés sur un spectromètre Bruker Avance III 850 MHz de l'Université de Warwick à la fréquence de 57 MHz. Les échantillons ont été placés dans un rotor de 7 mm auquel a été appliquée une rotation à l'angle magique (MAS) de 4 kHz.

A3. Microscopie

Microscopie électronique à balayage (MEB)/Analyse chimique (EDS)

Les observations au microscope électronique à balayage (MEB) ont été faites en utilisant un microscope Leo 435 VP. La tension d'accélération a été fixée à 7 kV, le courant de sonde à 50 pA, le diaphragme à 30 μm avec un échantillon placé à 15 mm. Les échantillons ont été métallisés à l'argent avant observation.

Microscopie électronique en transmission (MET)/diffraction électronique

Les différentes images MET ont été obtenues avec un microscope JEOL Jsm 2100F haute résolution. En vue de l'observation des échantillons, une petite quantité de poudre a été dispersée par ultrasons dans une solution d'acétone anhydre. Une goutte de cette suspension est ensuite déposée sur une grille de cuivre recouverte de Formvar.

A4. Autres analyses

Analyses thermogravimétriques

Les analyses thermogravimétriques (ATG-ATD) ont été réalisées en utilisant un système Setaram Instrumentation Setsys evolution de 30°C à 500°C avec une rampe à 5°C par minute.

Dosage du calcium et du phosphate.

Une même solution mère de CPP est préparée pour le dosage des ions calcium et phosphate dans le composé. Cette solution mère de 100 mL est préparée à partir de 100 mg de solide dissout dans 1 mL d'une solution d'acide perchlorique (6 M) puis complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'eau désionisée dans une fiole de 100 mL.

Les ions calcium sont dosés par volumétrie en retour après complexation avec l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) en présence d'ammoniaque.[Charlot, 1974] L'excès d'EDTA est dosé par une

solution titrée de chlorure de zinc. L'indicateur de virage utilisé est le noir d'ériochrome (NET). Le virage est observé par un changement de la coloration de la solution de bleue à rose. L'incertitude sur la teneur en calcium est de l'ordre de 1% massique.

Les ions orthophosphates sont dosés par colorimétrie.[Charlot, 1974] Cette méthode consiste à mesurer la densité optique (absorbance) de la coloration jaune d'un complexe phosphovanadomolybdique $\text{VO}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$ en milieu acide à $\lambda = 460 \text{ nm}$. Le réactif colorimétrique est préparé par mélange d'une solution de molybdate d'ammonium (80 g/L) et d'une solution de monovanadate d'ammonium (4 g/L) dans les proportions 50/50 en volume. Les absorbances des différentes solutions (solutions étalons et solution à doser) sont mesurées dans des cuves en quartz, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible *Hitachi U-1100* à simple faisceau. Cette méthode de dosage permet de déterminer la teneur en ions orthophosphates présents dans la solution et donc dans le composé mais pas celle des ions pyrophosphates.

En complément, nous pouvons hydrolyser totalement les ions pyrophosphates, en plaçant la solution mère dans un bain à 100°C en présence d'acide perchlorique 6 M. Les ions orthophosphates formés (qui s'ajoutent aux ions orthophosphates éventuellement déjà présents dans le composé) sont ensuite dosés comme précédemment. L'erreur relative du dosage du phosphore est de l'ordre de 1%. Ainsi par différence entre ce deuxième dosage des ions orthophosphates (ions orthophosphates présents initialement et ions orthophosphates résultant de l'hydrolyse des ions pyrophosphates) et celui du premier dosage ((ions orthophosphates initialement présents seulement), on peut déterminer la teneur en ions pyrophosphates de la solution mère et donc dans la phase CPP synthétisée.

Mesure de la surface spécifique

La surface spécifique des échantillons a été évaluée par la méthode Brunauer–Emmett–Teller (adsorption d'azote) à l'aide d'un appareil Quantachrome Instruments Monosorb Nova 1000. L'erreur relative est estimée à $0.5 \text{ m}^2/\text{g}$.

B. Description des diffractomètres utilisés pour l'analyse structurale

Cette section s'attachera à décrire le fonctionnement basique des diffractomètres ainsi que les rayonnements utilisés au cours de cette thèse. Des analyses sont effectuées en comparant les diagrammes obtenus par les différentes techniques et leurs spécificités.

B1. Description sommaire des caractéristiques des instruments

Bruker D8 Advance

Le diffractomètre utilisé au laboratoire pour les analyses courantes est un Bruker D8 Advance équipé d'un détecteur LynxEye d'un rayon de 300 mm. La source de rayonnement est un tube de rayons X scellé céramique SIEMENS à anticathode cuivre ($\lambda(K\alpha_1) = 1,54056 \text{ \AA}$, $\lambda(K\alpha_2) = 1,54433 \text{ \AA}$, $I_2/I_1 = 0,5$) d'une puissance de 40 kV x 40 mA. Un filtre de suppression de rayonnement nickel est utilisé pour atténuer le rayonnement $K\beta$ à 0,5 %. La divergence est réduite pour nos acquisitions par des fentes de divergence avant réglées à $0,1^\circ$ et par des fentes de Soller à $2,5^\circ$. Le détecteur ultra-rapide LynxEye possède une ouverture de $2,73^\circ$.

Les acquisitions sont réalisées avec un pas de $0,02^\circ$ et un temps d'acquisition par pas de 1920 s sur un échantillon plan en rotation.

Diffractomètre 2-cercles ligne Cristal du synchrotron Soleil (Gif-sur-Yvette)

L'acquisition de diagrammes de diffraction de rayons X sur synchrotron a été réalisée sur le diffractomètre 2-cercles de la ligne Cristal, au synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette) dans le cadre du projet *Structural investigations on hydrated calcium pyrophosphate phases of biological interest: study on synthetic and biological samples* (Proposal n°20130932, Cristal beamline, 19-22 february 2014) réalisé en collaboration notamment avec l'Inserm U606 de l'Hôpital Lariboisière à Paris.

Un faisceau monochromatique issu de l'ondulateur U20 a été sélectionné en utilisant un monochromateur à deux cristaux Si(111). Sa longueur d'onde de $\lambda = 0,72442 \text{ \AA}$ soit 17115 eV a été déterminée en utilisant un standard NIST LaB₆. La taille du faisceau est de $400 \mu\text{m}$, obtenue sans focalisation .

Une haute résolution angulaire a été obtenue par l'utilisation de 21 cristaux parfaits de Si(111) décalés d'environ $1,3^\circ$ montés avant le détecteur sur le diffractomètre deux cercles. La mesure est effectuée en transmission après que l'échantillon ait été placé dans un capillaire ($0,7 \text{ mm}$ de diamètre) en verre

spécial et en rotation.

Les acquisitions sont réalisées par des scintillateurs YAP, CeBr₃ Scionix. Le pas utilisé et le temps d'acquisition furent variables suivant les échantillons afin d'optimiser le temps de faisceau.

Diffractomètre PYRRHIAS ligne G4-1 réacteur Orphée LLB (Gif-sur-Yvette)

L'acquisition de diagrammes de diffraction des neutrons a été réalisée sur le diffractomètre PYRRHIAS de la ligne G4-1, au réacteur Orphée (Gif-sur-Yvette). Le faisceau de neutrons froids G4 a été utilisé avec une longueur d'onde de $\lambda = 2,423\text{\AA}$.

L'échantillon est placé dans un conteneur de 8 x 50 mm². L'atmosphère est placée sous vide primaire lors des acquisitions standards.

L'appareil G4-1 est un diffractomètre 2-axes composé d'un monochromateur graphite pyrolytique (002) et d'un multi-détecteur de 800 cellules-compteurs BF₃ couvrant 80° avec un pas de 0.1°.

B2. Comparaison des diagrammes obtenus

Chaque diagramme de diffraction ayant été acquis dans des conditions différentes, ils possèdent leurs propres caractéristiques. Nous tenterons d'illustrer les différences entre les techniques par deux exemples : la résolution instrumentale et la diffraction RX/neutrons.

Résolution instrumentale : fonction de Caglioti

Les résolutions instrumentales sont présentées sous une forme dérivée de la fonction de Caglioti $\text{FWHM} = f(\tan \theta)$. Les différents diagrammes n'ayant pas été effectués à la même longueur d'onde, la résolution spatiale sera donc représentée sur un diagramme $\Delta Q = f(Q)$ avec $Q = 4\pi \sin\theta/\lambda$ le vecteur d'onde et ΔQ la variation du vecteur d'onde $\Delta Q = 4\pi [\sin(\theta_k + \Delta\theta_{\text{FWHM}}/2) - \sin(\theta_k - \Delta\theta_{\text{FWHM}}/2)] / \lambda$ (figure III-2). Les deux courbes, sur D8 Advance et la ligne Cristal, sont réalisées à partir d'un standard NIST de LaB₆.

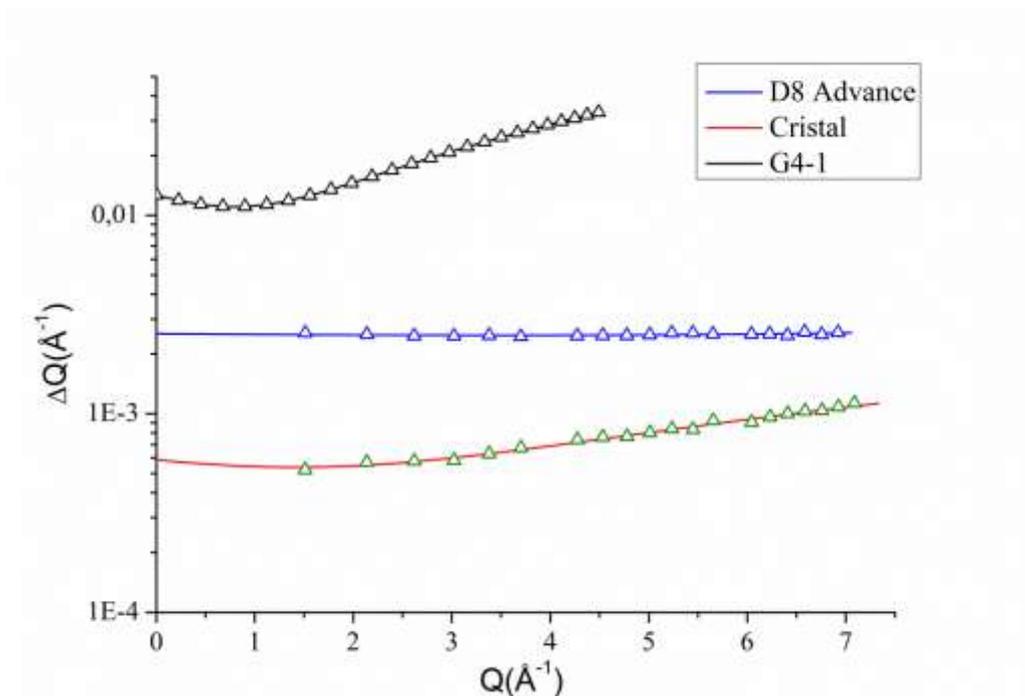


Figure VI-1 : Contribution instrumentale des différents instruments utilisés lors de cette étude avec $Q = 4\pi \sin\theta/\lambda$.

La résolution du diffractomètre de la ligne Cristal est plus élevée que celle du diffractomètre de laboratoire de fait des caractéristiques du faisceau synchrotron et de sa résolution angulaire importante. Ces différences sont particulièrement visibles aux bas angles, dans la partie du diagramme où la résolution de la ligne Cristal est optimisée. L'exemple de l'analyse d'une phase de basse symétrie, telle que celle de t-CPPD, permet de visualiser ces différences sur plusieurs parties du diagramme (figure VI-2).

L'asymétrie est particulièrement visible aux bas angles sur le diagramme réalisé avec le diffractomètre D8 Advance du laboratoire CIRIMAT. L'utilisation d'un capillaire lors de l'acquisition du diagramme sur la ligne Cristal permet de réduire notablement cette asymétrie. De plus le rayonnement utilisé avec le Bruker D8 Advance n'est pas monochromatique, ce qui conduit à un élargissement des réflexions aux bas angles et à l'apparition d'un deuxième pic sous la forme d'un épaulement dès $1,52 \text{ \AA}^{-1}$ soit $21,56^\circ$ en 2θ avec $\lambda_{\text{Cu}}(\text{K}\alpha)$. Remarquons que la résolution plus importante obtenue avec un rayonnement synchrotron permet la différenciation de pics confondus précédemment, notamment à $2,01 \text{ \AA}^{-1}$. Le recouvrement des pics est ainsi réduit, notamment dans le massif correspondant aux grands angles, augmentant d'autant la résolution spatiale maximale possible sur la structure.

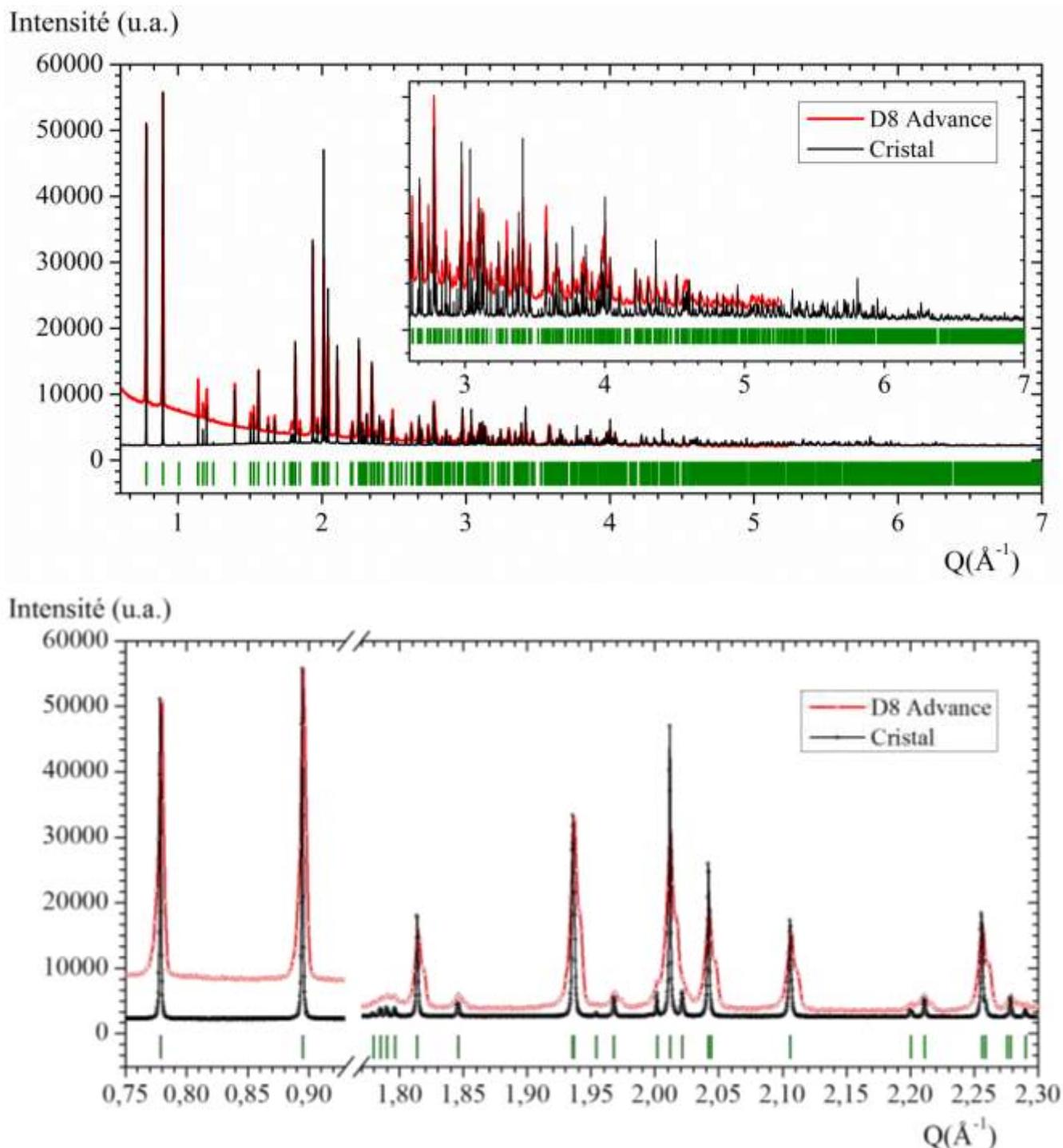


Figure VI-2 : Diagrammes de diffraction des RX de la phase t-CPPD réalisés sur différents instruments utilisés lors de cette étude avec $Q=4\pi \sin\theta/\lambda$. Le diagramme rouge est acquis au laboratoire sur un diffractomètre Bruker D8 Advance et le diagramme noir sur la ligne Cristal du synchrotron SOLEIL. Les positions des pics de Bragg sont indiquées en vert. Sur ce graphique, les zéros ne sont pas corrigés.

La résolution de la ligne G4-1 est la plus faible des instruments utilisés, cette ligne n'étant pas dévolue à la résolution de structures cristallines mais plutôt de structures magnétiques ou à l'étude de transitions de phases (figure VI-3). Les informations fournies par la diffraction des neutrons sont cependant d'une importance majeure pour l'étude de certains noyaux, notamment le placement des atomes d'hydrogène. La diffraction des neutrons étant notamment sensible à des noyaux ayant des

longueurs de diffusion élevées et donc, comparativement à la diffraction de rayons X, des atomes légers tels que H, D, Li, C, N, O.... Dans le cas particulier de l'hydrogène, la diffusion incohérente augmente cependant le bruit de fond rendant parfois l'analyse plus difficile. Ce désavantage peut être contourné par l'utilisation d'atomes de deutérium, via l'eau deutérée, possédant eux une grande longueur de diffusion sans diffusion incohérente.

Nous utiliserons ainsi les données de diffraction des neutrons afin de confirmer les structures obtenues par diffraction des rayons X, notamment les positions des atomes d'hydrogène.

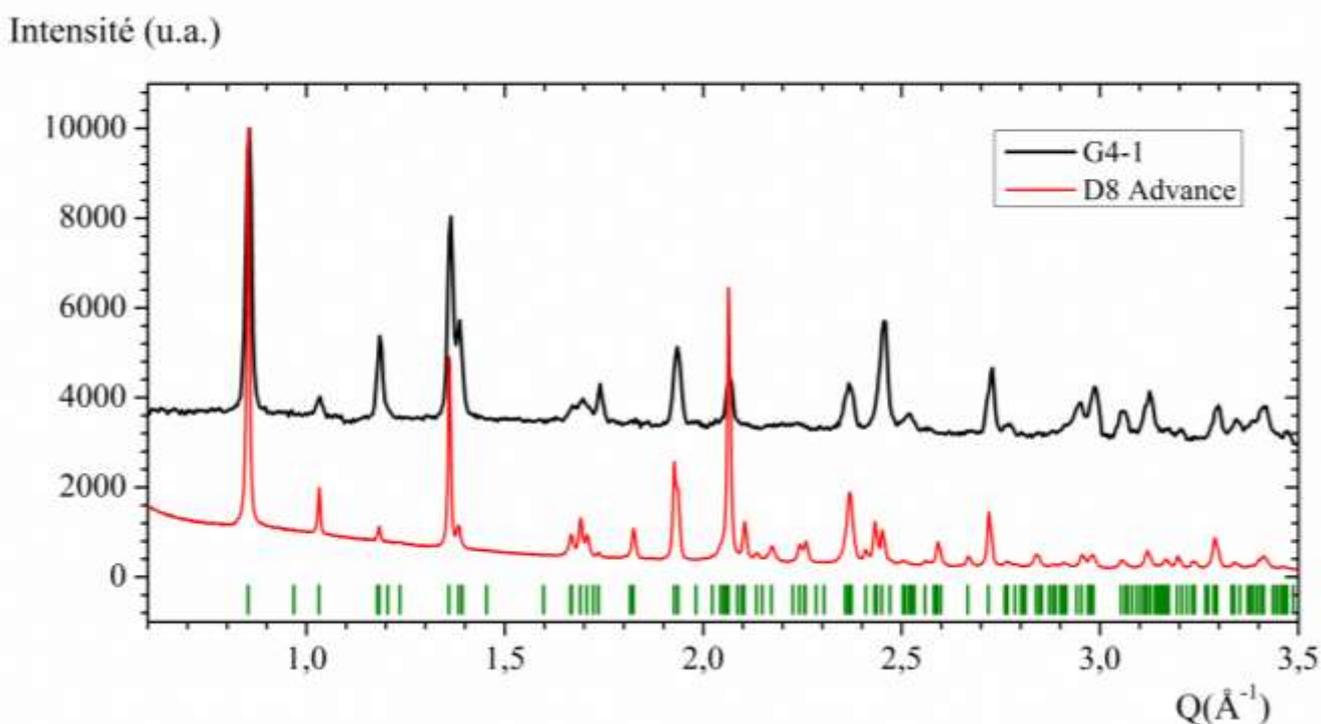


Figure VI-3 : Diagrammes de diffraction des RX de la phase t-CPPD réalisés sur différents instruments utilisés lors de cette étude avec $Q = 4\pi \sin\theta/\lambda$. Le diagramme rouge est acquis au laboratoire sur un diffractomètre Bruker D8 Advance et le diagramme noir sur la ligne G4-1 du réacteur Orphée. Les positions des pics de Bragg sont indiquées en vert. Sur ce graphique, les zéros ne sont pas corrigés.

C. Théorie de la diffraction des rayons X sur poudre

C1. Intensité des réflexions observées

L'intensité intégrée d'une réflexion d'indice (hkl) est donnée par la théorie cinématique de la diffraction des rayons X dans le cas d'un cristal idéalement imparfait de forme pavé mesurée par un diffractomètre à fente fixe [Bish & Howard, 1988; Chateigner, 2010] :

$$I_{hkl} = \left(\frac{I_0 \lambda^3 A}{32\pi R} \right) \cdot \frac{1}{2\mu} \cdot \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 m_e c^2} \right)^2 \cdot \frac{J_{hkl}}{V_C^2} \cdot L(\theta_{hkl}) \cdot P(\theta_{hkl}) \cdot O_i \cdot |F_{hkl}|^2 \quad (\text{VI-1})$$

Avec : - I_0 l'intensité du faisceau incident

- λ la longueur d'onde du faisceau incident $\lambda_{K\alpha_1}(\text{Cu})=1,54056 \text{ \AA}$
- A l'aire de la fente du détecteur, soit la partie du cône de diffraction mesurée par l'appareil
- R le rayon du diffractomètre (distance source-échantillon et échantillon-détecteur)
- μ le coefficient linéaire d'absorption et $\frac{1}{2\mu}$ le facteur d'absorption
- $\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 m_e c^2} = r_e$ le rayon classique de l'électron, e sa charge et m_e sa masse.
- J_{hkl} la multiplicité de la réflexion (hkl)
- V_C le volume de la maille
- $L(\theta_{hkl}) = \frac{1}{\sin \theta_{hkl} \sin 2\theta_{hkl}}$ le facteur de Lorentz et le facteur géométrique en géométrie Bragg-Brentano.
- $P(\theta_{hkl}) = \frac{1-K+K \cos^2 2\theta_{hkl} \cos^2 2\theta_m}{1 + \cos^2 2\theta_m}$ le facteur de polarisation, représentant l'action du monochromateur sur le faisceau X avec θ_m l'angle de la réflexion de Bragg utilisé sur le monochromateur. K rend compte de la possibilité de polarisation du faisceau incident : $K=0,5$ pour un rayonnement classique et $K \approx 0,1$ pour un rayonnement synchrotron ($K=0$ pour un faisceau neutron non polarisable).
- O_i le facteur d'orientation préférentielle
- F_{hkl} est le facteur de structure de la réflexion, soit la transformée de Fourier de la densité

électronique ρ :

$$F_{hkl} = V_c \iiint_{x,y,z=0}^1 \rho(x,y,z) \cdot \exp [2\pi i(kx + ky + lz)] dx dy dz \quad (\text{VI-2})$$

En décomposant ce facteur sur les différents atomes i de la maille :

$$F_{hkl} = \sum_j N_j \cdot f_j \cdot \exp \left(-\frac{B_j \sin^2 \theta_{hkl}}{\lambda^2} \right) \cdot \exp [2\pi i(kx_j + ky_j + lz_j)] \quad (\text{VI-3})$$

Avec - N_j le taux d'occupation de l'atome j

- $f_j = f_{0j} + \Delta f_j' + i\Delta f_j''$ le facteur de diffusion de l'atome, $\Delta f_j'$ et $\Delta f_j''$ représentant la variation en amplitude et phase du facteur de diffusion par rapport à f_{0j} dans le cas d'une diffusion anormale.

- $\exp \left(-\frac{B_j \sin^2 \theta_{hkl}}{\lambda^2} \right)$ le facteur de Debye-Waller, avec

$$B_j = 8\pi^2 \overline{u_j^2} \quad (\text{VI-4})$$

où $\overline{u_j^2}$ est le déplacement quadratique moyen de l'atome j à la température d'acquisition et x_j, y_j, z_j les coordonnées réduites de l'atome j dans la maille.

Cette expression complète peut se simplifier en associant les constantes de l'équation (VI-1) et donne ainsi :

$$I_{hkl} = S \cdot J_{hkl} \cdot L(\theta_{hkl}) \cdot P(\theta_{hkl}) \cdot O_i \cdot |F_{hkl}|^2 \quad (\text{VI-5})$$

S pouvant être assimilé à un facteur d'échelle commun à toutes les réflexions.

Revenons finalement au facteur d'orientation préférentielle O_i qui peut entrer en compte dans l'intensité des raies de diffraction mesurées. Une répartition non aléatoire des cristallites, liée à la forme de ces cristallites, favorise la diffraction suivant certaines directions préférentielles. Ainsi certaines réflexions seront sur-représentées par rapport à d'autres à cause d'une interaction plus

grande avec le faisceau incident. Cet effet est très sensible à certaines morphologies fortement orientées, notamment aciculaires ou en plaquettes et surtout à la préparation des échantillons. Il est nécessaire d'effectuer une préparation correctement, en appliquant le moins de pression possible sur l'échantillon, afin de limiter cet effet et d'appliquer une correction dans le cas de morphologies fortement orientées, spécialement si le dispositif de mesure n'est pas adapté. Nous utiliserons le modèle de March-Dollase afin d'appliquer cette correction [March, 1932; Dollase, 1986].

$$O_i = \frac{1}{J_{hkl}} \sum_{n=1}^{J_{hkl}} \left(P_{MD}^2 \cos^2 \alpha_n + \frac{\sin^2 \alpha_n}{P_{MD}} \right)^{-\frac{3}{2}} \quad (\text{VI-6})$$

Avec P_{MD} le facteur de March-Dollase tel que :

$P_{MD} > 1$ si la forme des cristallites est plaquettaire et α_n est l'angle entre la normale au plan du cristallite et l'axe de diffusion

$P_{MD} = 1$ s'il n'y a pas d'orientation préférentielle

$P_{MD} < 1$ si la forme des cristallites est aciculaire et α_n est l'angle entre l'axe de l'aiguille et l'axe de diffusion.

C2. Profil de la réflexion

L'intensité du signal étant définie, il est nécessaire s'intéresser à sa forme. Afin d'obtenir le profil complet d'un signal détecté, il est nécessaire de prendre en compte différentes contributions, intrinsèques et instrumentales. Ces différentes contributions sont prises en compte par la convolution des contributions intrinsèque I_{crist} et instrumentale I_{instr} (VI-7) [Langford, 2000] :

$$I = \int I_{crist}(2\theta) \cdot I_{instr}(2\theta - 2\theta') d(2\theta') = I_{crist}(2\theta) \otimes I_{instr}(2\theta) \quad (\text{VI-7})$$

Contributions intrinsèques

- La contribution intrinsèque comprend la largeur de Darwin du signal diffracté ainsi que l'effet de la microstructure. La largeur de Darwin sur un cristal parfait (*rocking curve*) est une conséquence du principe d'incertitude d'Heisenberg $\Delta p \Delta x = h$. Le coefficient d'absorption non nul implique que le photon soit localisé dans un petit volume. Ainsi, d'après la relation de de Broglie

entre quantité de mouvement et longueur d'onde $\Delta\lambda=h/\Delta p$, le faisceau diffracté possède une distribution finie de longueurs d'onde diffractées et suit un profil lorentzien par défaut. S'ajoutent les contributions de la microstructure causées par la taille des cristallites et les distorsions du réseau cristallin.

- Les effets de taille de cristallite, ou plus précisément de taille des domaines cohérents de diffraction, provoquent un élargissement du pic de Dirac issu de la diffraction idéale. Le profil de la réflexion observé est alors lorentzien et sa dispersion prédite par la formule de Scherrer [Scherrer, 1918] :

$$L_{hkl} = \frac{K_{Sz} \lambda}{\Gamma \cos(\theta)} \quad (\text{VI-8})$$

avec L_{hkl} la taille moyenne des cristallites (en Å) dans la direction perpendiculaire aux plans (hkl) si λ la longueur d'onde du faisceau est en Å

K_{Sz} une constante proche de 1 (généralement prise à 0,94 pour dans le cas des phosphates de calcium)

θ l'angle de Bragg au sommet de la raie

Γ la largeur de raie intrinsèque, en radian, pour la réflexion. Même si la largeur intégrale (aire du pic divisée par sa hauteur) est préférable à la largeur à mi-hauteur généralement utilisée, nous utiliserons largeur à mi-hauteur par la suite par convention. Notons que $L_{hkl} = K_{Sz} \lambda/\Gamma$ dans le cas de la largeur intégrale.

La valeur de la largeur de raie intrinsèque, sans la contribution instrumentale, $\Gamma = \sqrt{\Gamma_r^2 - \Gamma_0^2}$ peut être obtenue à partir d'une mesure sur l'échantillon Γ_r et de la largeur de raie d'un échantillon de référence cristallisé Γ_0 . Ceci est aussi valable pour un profil gaussien ($\Gamma = \Gamma_r - \Gamma_0$ pour un profil lorentzien) et est applicable à toutes les largeurs de raies évoquées par la suite.

- Les distorsions du réseau cristallin (*strain*), et les micro-contraintes associées, peuvent être dues à des défauts cristallins, des solutions solides ou à des contraintes extérieures appliquées sur les cristaux. Elles provoquent des déformations de la maille et donc des écarts de distances interréticulaires Δd_{hkl} observées en diffraction. Les profils associés sont de forme gaussienne avec une largeur de raie intrinsèque Γ' [Stokes & Wilson, 1942]:

$$\Gamma' = 4 \eta_{St} \tan(\theta) \quad (\text{VI-9})$$

Avec η_{St} la déformation relative $\Delta d_{hkl}/d_{hkl}$ (St : strain). Notons que $\Gamma' = 4 \eta_{St}$ dans le cas de la largeur intégrale.

Notons également que les deux expressions (VI-8) et (VI-9) additionnées donneront l'expression de Williamson et Hall (VI-10) couramment utilisées pour évaluer les tailles de cristallites et les contraintes associées [Williamson & Hall, 1953]:

$$\frac{\Gamma_{tot} \cos(\theta)}{\lambda} = \frac{K_{Sz}}{L_{hkl}} + 4 \eta_{St} \frac{\sin(\theta)}{\lambda} \quad (\text{VI-10})$$

Les valeurs obtenues basées sur la largeur de pic pourront être comparées à celles correspondant au profil du pic, les contributions gaussiennes et lorentziennes de la fonction pseudo-Voigt, fournissant elles aussi une information sur la taille des cristallites.

- Le rayon incident interagit également sur une certaine profondeur avec l'échantillon, dépendant de son coefficient d'absorption. Un faible coefficient d'absorption implique une pénétration plus grande décalant le pic observé et donc une large asymétrie vers les petits angles, en approximativement $\cos \theta$.

Contributions instrumentales

La contribution instrumentale est issue en partie des optiques de l'appareil utilisé, munis de fentes avant, de réception et de Soller avant et arrière causant un profil gaussien par convolution du faisceau avec un profil de marche, ou fonction porte. Cependant une partie importante de la contribution instrumentale se retrouve dans l'asymétrie du signal. Il existe deux principales sources d'asymétrie lors d'une acquisition de diagramme de diffraction des rayons X :

- La première source d'asymétrie provient potentiellement de l'utilisation d'un échantillon plan et non courbe, qui permettrait une convergence parfaite sur le détecteur. Cela se traduit par une asymétrie en $\cotan \theta$, plus forte à petit angle. Afin de limiter cette divergence horizontale, des fentes avant ou fente de divergence sont utilisées limitant la divergence du faisceau incident et des fentes arrière ou anti-diffusion sont placées entre l'échantillon et le détecteur pour limiter la portion analysée par le détecteur. Des capillaires cylindriques peuvent aussi être utilisés mais une correction de l'intensité transmise doit alors être appliquée.

- La deuxième source d'asymétrie, la divergence axiale provient de la largeur de faisceau utilisé, non négligeable (1 cm) afin d'augmenter l'intensité reçue. Cette intensité peut donc provenir de réflexions différentes, ne correspondant pas au 2θ mesuré. L'asymétrie engendrée est dépendante en $\cotan 2\theta$. Les fentes de Soller, avant et arrière, divisent le faisceau afin de limiter le recouvrement dans l'axe de l'échantillon, et ainsi de paralléliser le signal [Birkholz, 2006].

- Finalement le faisceau incident possède lui aussi une distribution spectrale lorentzienne avec une certaine largeur à mi-hauteur. Celle-ci est estimée à $4,37 \cdot 10^{-4}$ Å pour un faisceau produit par la transition K d'un tube scellé à anode de cuivre et à $1 \cdot 10^{-6}$ Å pour un rayonnement synchrotron. Le profil d'émission d'un tube scellé à anode de cuivre est par ailleurs légèrement asymétrique [Snyder, 1999].

Les contributions instrumentales sont prépondérantes par rapport aux contributions intrinsèques dans le cas de la diffraction des neutrons.

C3. Modélisation du profil

Du fait de leurs variétés, les contributions instrumentales peuvent être déterminées à partir du diagramme d'un échantillon de référence, standard NIST LaB_6 dans notre cas, considéré comme parfait. Le diagramme de référence doit être obtenu dans les mêmes conditions que celui de l'échantillon analysé. Les paramètres de profil attribués à l'élargissement instrumental ainsi obtenus seront utilisés lors de l'affinement sur l'échantillon souhaité. Les contributions intrinsèques pourront ainsi être extraites, et fournir des informations sur la taille des cristallites, les distorsions présentes, l'orientation préférentielle ou la cristallinité.

Toutes ces contributions peuvent être simulées indépendamment en approche fondamentale ou par des fonctions associées. Ces fonctions doivent simuler les composantes gaussiennes, lorentzienne et asymétrique du profil de raie. On dispose pour cela de différents modèles, pour des contributions symétriques et/ou asymétriques. La forme et la largeur de raie sont ainsi modélisées.

Fonctions gaussienne et lorentzienne

- La fonction gaussienne est définie par l'expression :

$$G(2\theta_i, \Gamma_k) = \frac{2 I_0}{\Gamma_k} \sqrt{\frac{\ln 2}{\pi}} \exp\left(-\frac{4 \ln 2}{\Gamma_k^2} (2\theta_i - 2\theta_k)^2\right) \quad (\text{VI-11})$$

Avec I_0 l'intensité intégrée du signal et $2/\Gamma_k \sqrt{\ln 2/\pi}$ le facteur de normalisation de la gaussienne.

$2\theta_i$ et $2\theta_k$ respectivement l'angle au point i du profil et à la réflexion k du cristal.

Γ_k la largeur de la réflexion k telle que :

$$\Gamma_G = \sqrt{U \tan^2 \theta + V \tan \theta + W + \frac{P}{\cos^2 \theta}} \quad (\text{VI-12})$$

Avec U , V , W et P les paramètres de résolution affine de la fonction. A noter que le paramètre P peut être noté Z , notamment dans le logiciel Topas [Coelho, 2009].

La fonction gaussienne est adaptée pour décrire les contributions instrumentales, et peut donc être utilisée dans le cas de la diffraction des neutrons.

La largeur intégrale (aire du pic divisée par sa hauteur) est encore une fois préférable à la largeur à mi-hauteur mais celle-ci est la plus généralement utilisée et sera utilisée par défaut ici.

- La fonction lorentzienne est définie par l'expression :

$$L(2\theta_i, \Gamma_k) = \frac{I_0 \sqrt{C}}{\pi \Gamma_k} \left[1 + C \left(\frac{2\theta_i - 2\theta_k}{\Gamma_k} \right)^2 \right]^{-m} \quad (\text{VI-13})$$

avec $C = 4(2^{1/m} - 1)$, m étant l'ordre lorentzien pouvant prendre toutes valeurs positives ou nulle.

$m = 1$ donne une fonction lorentzienne pure, $m = 2$ une fonction lorentzienne « modifiée » décrite par Sonneveld & Visser [Sonneveld & Visser, 1975]. Une autre fonction dérivant de la fonction lorentzienne et largement utilisée pour simuler une réflexion est la fonction Pearson VII et sa modification, la fonction Pearson VII divisée [Toraya, 1986].

- $I_0 \sqrt{C}/\pi \Gamma_k$ est le facteur de normalisation de la fonction lorentzienne.

La fonction Voigt représentant la convolution des fonctions lorentzienne et gaussienne pourrait donc décrire la forme d'une réflexion. La complexité du calcul de la convolution a favorisé le développement de fonctions plus simples pour la modélisation des profils.

Pseudo-Voigt

L'un des modèles les plus simples de combinaison de fonction gaussienne et lorentzienne repose sur la fonction pseudo-Voigt $pV(2\theta)$, soit l'addition d'une contribution lorentzienne $L(\Gamma)$ et d'une contribution gaussienne $G(\Gamma)$ pondérée par un facteur η :

$$pV(2\theta, \Gamma) = \eta L(2\theta, \Gamma) + (1 - \eta) G(2\theta, \Gamma) \quad (\text{VI-14})$$

Avec Γ la largeur de raie, pour la réflexion. Γ peut être définie simplement par la fonction de Caglioti [Caglioti *et al.*, 1958] :

$$\Gamma = \sqrt{U \tan^2 \theta + V \tan \theta + W} \quad (\text{VI-15})$$

avec U , V et W ajustables suivant l'échantillon utilisé. U est généralement positif et V négatif.

Pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings

Cette fonction, encore largement utilisée, a été modifiée afin de prendre en compte les différentes contributions mentionnées. Les fonctions pseudo-Voigt dérivées de celle mentionnée, notamment pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings, sont ainsi particulièrement utilisées dans le cas des rayons X. Nous utiliserons dans notre cas la fonction pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings, disponible dans FullProf, Jana2006 et TOPAS, qui s'est avérée correspondre au profil de raie observée. La largeur de raie Γ et le paramètre η utilisés dépendent de deux fonctions gaussienne et lorentzienne indépendantes et découlent des formules [Thompson *et al.*, 1987] :

$$pV(2\theta, \Gamma) = \eta L(2\theta, \Gamma) + (1 - \eta) G(2\theta, \Gamma) \quad (\text{VI-16})$$

$$\Gamma = (\Gamma_G^5 + 2,69296 \Gamma_G^4 \Gamma_L + 2,42843 \Gamma_G^3 \Gamma_L^2 + 4,47163 \Gamma_G^2 \Gamma_L^3 + 0,07842 \Gamma_G \Gamma_L^4 + \Gamma_L^5)^{\frac{1}{5}} \quad (\text{VI-17})$$

$$\eta = 1,36603 \frac{\Gamma_L}{\Gamma} - 0,47719 \left(\frac{\Gamma_L}{\Gamma}\right)^2 + 0,11116 \left(\frac{\Gamma_L}{\Gamma}\right)^3 \quad (\text{VI-18})$$

avec Γ_G et Γ_L les largeurs de raie des composantes gaussienne et lorentzienne respectivement. Ces deux contributions sont données par les formules :

$$\Gamma_G = \sqrt{U \tan^2 \theta + V \tan \theta + W + \frac{P}{\cos^2 \theta}} \quad (\text{VI-19})$$

$$\Gamma_L = X \tan \theta + \frac{Y}{\cos \theta} \quad (\text{VI-20})$$

avec U, V, W, P, X, Y des paramètres ajustables. U et X sont attribués aux effets de déformation, indiqués par la suite par l'indice St, Y et P à la taille isotrope des particules, d'indice Sz, et V et W à l'instrument (indice Instr) La taille des cristallites et la déformation peuvent ainsi être obtenues dans ce cas isotrope par les équations (VI-8), (VI-9), (VI-19) et (VI-20) combinées en tenant compte des contributions lorentzienne et gaussienne de chacune donnant :

$$L_{Sz Iso} = \frac{\pi K_{Sz} \lambda}{180 Y} \quad (\text{VI-21})$$

$$\eta_{St Iso} = \frac{100 \pi \sqrt{U}}{180} \% \quad (\text{VI-22})$$

Pseudo-Voigt anisotropique paramétrée

En modifiant les équations (VI-19) et (VI-20) pour faire apparaître les contributions instrumentales suivant Popa et Stephens dans les cas anisotropes, on obtient l'équation pseudo-Voigt anisotropique paramétrée [Popa, 1998; Stephens, 1999]. On observe ainsi deux classes de paramètres agissant sur les déformations et les tailles de particules dans le cas anisotrope :

$$\Gamma_G = \left[(U_{Instr} + U_{St Iso}) \tan^2 \theta + V_{Instr} \tan \theta + W_{Instr} + \frac{P_{Iso Sz}}{\cos^2 \theta} + (1 - \zeta)^2 \Gamma_{Ani St}^2(hkl) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{VI-23})$$

$$\Gamma_L = (X_{Instr} + X_{Iso St}) \tan \theta + \frac{Y_{Instr} + Y_{Iso Sz} + Y_{Ani Sz}}{\cos \theta} + \zeta \Gamma_{Ani St}(hkl) \quad (\text{VI-24})$$

- avec ζ un paramètre d'ajustement entre profil gaussien et lorentzien et $\Gamma_{Ani St}(hkl)$ la contribution anisotropique de déformation donnée par l'expression :

$$\Gamma_{Ani\ St}(hkl) = \sqrt{\sigma^2(M_{hkl})} \tan \theta / M_{hkl} \quad (VI-25)$$

et $\sigma^2(M_{hkl})$ la variance de $M_{hkl} = 1/d_{hkl}^2$ avec d_{hkl} la distance interplanaire. La valeur $M_{hkl}/\sqrt{\sigma^2(M_{hkl})} = \Delta d_{hkl}/d_{hkl}$ est ainsi associée à la déformation η_{St} par l'équation (VI-9).

De plus :

$$\sigma^2(M_{hkl}) = \sum_{HKL} S_{HKL} h^H k^K l^L \quad (VI-26)$$

avec des coefficients ajustables S_{HKL} et des indices H, K et L (différents de indices de Miller hkl) représentant les permutations d'entiers positifs respectant $H + K + L = 4$. Ces coefficients sont restreints par la classe de Laüe considérée, de 2 pour un système cubique à 15 pour un système triclinique. Ils fournissent ainsi une description des déformations anisotropes.

- De la même façon, les contributions aux effets de taille peuvent être différenciées suivant les orientations par un développement en harmoniques sphériques en généralisant l'équation (VI-21) [Kara & Kurki-Suonio, 1981] :

$$Y_{Ani\ Sz} = \frac{180 S_{Ani\ Sz}(\theta, \varphi) \lambda}{\pi} \quad (VI-27)$$

avec θ et φ les coordonnées sphériques d'un point dans l'espace de la maille

$S_{Ani\ Sz}(\theta, \varphi) = \sum_{l,m} C_{l,m} Y_{l,m}(\theta, \varphi)$ représente le diamètre moyen des particules dans la direction (θ, φ) .

$Y_{l,m}(\theta, \varphi)$ les fonctions harmoniques sphériques

$C_{l,m}$ les coefficients attribués à chaque $Y_{l,m}(\theta, \varphi)$

La fonction $S_{Ani\ Sz}(\theta, \varphi)$ doit avoir une symétrie compatible avec la classe de Laüe considérée, notamment en présence d'un centre d'inversion.

Ces modèles sont particulièrement adaptés aux cas de cristaux fortement orientés tels que les cristaux de pyrophosphate de calcium décrits dans le chapitre II.

C4. Modélisation de l'asymétrie

Les pics observés possèdent souvent une allure asymétrique, surtout prononcée aux bas angles. Ce profil provient, nous l'avons vu, de plusieurs contributions, principalement instrumentales, dues en partie à la configuration Bragg-Brentano. Un facteur d'asymétrie est donc introduit durant la modélisation par multiplication avec l'intensité calculée. Il existe plusieurs modèles pour simuler cet effet, nous présenterons ici les modèles disponibles dans les logiciels utilisés au cours de cette thèse.

Correction de Rietveld

Cette correction est la plus simple et s'exprime par [Rietveld, 1969] :

$$A(2\theta_i - 2\theta_k) = 1 - A \cdot \text{sign}(2\theta_i - 2\theta_k) \cdot \frac{(2\theta_i - 2\theta_k)^2}{\tan \theta_k} \quad (\text{VI-28})$$

A est un paramètre affuable et $2\theta_i$ et $2\theta_k$ respectivement l'angle au point i du profil et à la réflexion k du cristal. Une simplification de cette expression est aussi utilisée pour décrire une fonction lorentzienne asymétrique AL [Chateigner, 2010] :

$$AL(2\theta_i - 2\theta_k) = A \cdot (2\theta_i - 2\theta_k) \cdot L \quad (\text{VI-29})$$

Avec L une fonction Lorentzienne pure.

Correction de Simpson et correction d'Howard

La fonction de profil est définie par Howard comme une somme de n pseudo-Voigt avec un décalage en 2θ tel que :

$$\Omega_{ik}(2\theta_i) = \sum_{l=1}^n g_l \cdot PV \left(2\theta_i - \frac{f_l(\alpha) P}{\tan 2\theta_k} \right) \quad (\text{VI-30})$$

avec P un paramètre d'asymétrie, avec P=0 pour un pic symétrique, g_l et $f_l(\alpha)$ les paramètres de l'intégration de Simpson, et α un coefficient rendant l'échantillonnage non équidistant. P et α sont affinés pour obtenir la meilleure correspondance.

Correction de Bérrar-Baldinozzi

La correction de Bérrar-Baldinozzi repose sur une modélisation des effets de divergence par deux fonctions : $\cotan 2\theta$, reliée à la divergence axiale, et $\cotan \theta$, reliée à la divergence horizontale :

$$A_{ik}(2\theta_i) = 1 + [P_1 + 2P_2 (2z^2 - 3)] \frac{F_a(z)}{\tan \theta_k} + [P_3 + 2P_4 (2z^2 - 3)] \frac{F_a(z)}{\tan 2\theta_k} \quad (\text{VI-31})$$

avec $z = 2\theta_i - 2\theta_k/\Gamma_k$ et $F_a(z) = 2z \exp(-z^2)$. P_1 , P_2 , P_3 et P_4 sont des paramètres affinales, tous égaux à 0 si le signal est symétrique.

Cette correction s'applique dans les cas de faible asymétrie.

Correction de Finger, Cox et Jephcoat

La correction de Finger *et al.* est le plus physique des modèles présentés jusqu'à présent. Elle s'exprime au travers de trois paramètres reliés à des grandeurs instrumentales :

L représente la distance échantillon-détecteur,

$2H$ l'ouverture des fentes du détecteur,

$2S$ la taille du faisceau sur l'échantillon ou la taille de l'échantillon si le faisceau est plus grand.

Pour la diffraction des rayons X sur poudre, $2H$ est la largeur horizontale de l'ouverture du détecteur et $2S$ est la taille horizontale du faisceau. Pour la diffraction des neutrons sur poudre, $2H$ est la largeur verticale de l'ouverture du détecteur et $2S$ est la taille verticale du faisceau.

Les paramètres S/L et H/L sont affinés pour modéliser l'asymétrie.

Cette correction sera utilisée pour l'analyse des profils de raies obtenus dans ce chapitre. La très forte corrélation entre H et S rend cependant la convergence difficile ; l'obtention de valeurs approximées à partir d'échantillons de référence devient alors essentielle.

Approche fondamentale

L'approche fondamentale, récemment implémentée dans les logiciels Topas et Jana2006 [Petricek *et al.*, 2006; Coelho, 2009], se base sur les paramètres instrumentaux tels qu'utilisés lors de l'acquisition du diagramme pour simuler les asymétries associées. Cette approche ne nécessite donc pas, en théorie, de mesures d'un échantillon de référence afin de séparer les différentes contributions.

Différents paramètres servent à simuler la courbe de profil observée, tels que les distances source-échantillon et échantillon-détecteur, les tailles de la source, de l'échantillon et de la fente détecteur et les ouvertures des différentes fentes. La contribution de chacun de ces paramètres a été décrite dans la section C2Chapitre VIC2.

Cette approche fut de bonne qualité pour l'analyse de diagrammes de rayons X obtenus avec les instruments de laboratoire, apportant un sens physique à chaque correction. Elle n'a cependant pas pu être mise en place pour l'analyse de diagrammes de diffraction de rayons X obtenus sur synchrotron ou encore ceux de diffraction des neutrons.

C5. Facteurs d'accord

Tous les modèles présentés dans cette section sont utilisés pour simuler les profils observés et extraire les différentes contributions afin d'accéder à celles que l'on souhaite étudier : structure cristallographique, contrainte sur le matériau ou autre. La qualité de l'affinement du profil et donc de l'estimation des différentes contributions est ainsi primordiale. Il existe plusieurs facteurs pouvant juger de cette qualité en se basant sur l'indexation donnée (paramètre de maille), l'intensité nette mesurée en chaque point du diagramme (affinement sans modèles structuraux) ou l'intensité intégrée des différentes réflexions (affinement avec modèles structuraux) :

- La qualité du groupe d'espace choisi, pré-requis pour tout affinement, peut être évaluée par deux figures de mérite.

La figure de mérite de de Wolff M_N :

$$M_N = \frac{Q_N}{2 \langle \Delta Q_N \rangle N_{poss}} \quad (\text{VI-32})$$

La figure de mérite de Smith et Snyder F_N :

$$M_N = \frac{N}{\langle \Delta(2\theta) \rangle N_{poss}} \quad (\text{VI-33})$$

avec $Q_N = 2\pi/d_N$ la valeur de Q pour le $N^{\text{ième}}$ pic observé, N_{poss} le nombre de pics théoriques possibles jusqu'à la valeur Q_N , et $\langle \Delta Q_N \rangle$ et $\langle \Delta(2\theta) \rangle$ les valeurs absolues des écarts moyens entre Q_{calc} et Q_{obs} , et $2\theta_{obs}$ et $2\theta_{calc}$ respectivement.

La première figure de mérite permet de juger l'indexation établie sur un diagramme donné, la deuxième évalue la qualité d'un diagramme en fonction de l'indexation fournie.

- L'écart entre profil observé et profil calculé peut être évalué par deux principaux facteurs de profil introduit par Rietveld. Le facteur de profil « *R-pattern* » est défini tel que :

$$R_p = \frac{\sum_i |y_{i\text{ obs}} - y_{i\text{ calc}}|}{\sum_i y_{i\text{ obs}}} \quad (\text{VI-34})$$

et le facteur de profil pondéré « *R-weighted profile* » :

$$R_{wp} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_{i\text{ obs}} - y_{i\text{ calc}})^2}{\sum_i w_i y_{i\text{ obs}}^2}} \quad (\text{VI-35})$$

Avec $y_{i\text{ obs}}$ et $y_{i\text{ calc}}$ l'intensité nette observée ou calculée à chaque point i du diagramme. Ces valeurs doivent être prises sans le fond continu. Du fait de la soustraction au numérateur, le fond continu diminue artificiellement la valeur des facteurs.

- w_i est un facteur de pondération pouvant varier suivant les logiciels utilisés mais généralement égal à $w_i = 1/\sigma^2$ avec σ^2 la variance de $y_{i\text{ obs}}$. Le bruit de fond (*background*) doit cependant être compté dans son estimation, faisant partie des erreurs produites, $\sum_i w_i (y_{i\text{ obs}} - y_{i\text{ calc}})^2$ pouvant représenter l'erreur quadratique moyenne du modèle pour un affinement idéal.

De fait, le nombre de paramètres à affiner varie, de nombreux paramètres sont liés entre eux dans l'évaluation du profil calculé et le nombre de points considéré dépend du nombre de points dans le diagramme observé. Ces facteurs sont ainsi largement influencés par la qualité de la ligne de base, les facteurs étant plus faibles pour un diagramme fortement bruité.

- Des paramètres ont ainsi été développés pour limiter cette dépendance.

➤ Le facteur χ^2 « *Goodness of fit* »

$$\chi^2 = \frac{\sum_i w_i (y_{i\text{ obs}} - y_{i\text{ calc}})^2}{N - P + C} = \left(\frac{R_{wp}}{R_{exp}} \right)^2 \quad (\text{VI-36})$$

➤ Le facteur d'erreur statistique « *R-expected* » est représenté par :

$$R_{exp} = \sqrt{\frac{N - P + C}{\sum_i w_i y_{i\,obs}^2}} = \frac{R_{wp}}{\sqrt{\chi^2}} \quad (\text{VI-37})$$

avec N le nombre de points du diagramme, P le nombre de paramètres affinés et C le nombre de contraintes sur ces paramètres. $N - P + C$ représente donc le nombre de degré de liberté. R_{exp} correspond à une valeur minimale pouvant être atteinte avec la courbe expérimentale. La valeur de χ^2 doit donc être la plus proche possible de 1. En pratique des valeurs plus élevées sont observées, l'erreur quadratique du modèle pour des affinements non idéaux ne correspondant pas à l'erreur statique.

- Finalement les facteurs de structure, reliés à l'affinement à partir d'un modèle structural, sont calculés à partir des intensités intégrées de chaque réflexion I .

➤ Le facteur de Bragg est défini tel que :

$$R_B = \frac{\sum_i |I_{i\,obs} - I_{i\,calc}|}{\sum_i I_{i\,obs}} \quad (\text{VI-38})$$

➤ et le facteur basé sur le facteur de structure F « *R-structure factor* » :

$$R_F = \frac{\sum_i |F_{i\,obs} - F_{i\,calc}|}{\sum_i F_{i\,obs}} \quad (\text{VI-39})$$

La fonction R_{wp} est la plus sensible à la fonction de profil et est donc utilisée comme facteur de convergence lors des affinements. R_p est utilisé dans la décomposition de Le Bail [Le Bail *et al.*, 1988]. Finalement R_B est utilisé pour valider un modèle structural, il correspond au facteur se rapprochant le plus du facteur R utilisé lors de l'affinement des intensités pour la résolution de structure sur monocristal.

Tous ces paramètres ont leurs avantages et leurs inconvénients. Ils ne peuvent pas rendre compte seuls de la qualité d'un affinement, l'observation des similarités et des différences entre profil observé et profil calculé, notamment à partir de la fonction différence $y_{i\,obs} - y_{i\,calc}$ reste le critère le plus fiable de la qualité d'un affinement [McCusker *et al.*, 1999].

D. Résolution structurale à partir de diagrammes de diffraction sur poudre

D1. Acquisition des données

Outre le réglage adapté du diffractomètre, réglage du zéro et des optiques, ses paramètres intrinsèques, doivent être déterminés par l'utilisation de composés de référence. Un standard NIST LaB₆ est utilisé comme composé de référence dans la plupart de nos expériences. Les données de diffraction doivent aussi pouvoir être exploitables pour la suite de l'analyse. La pureté et la cristallinité du composé doivent être ainsi vérifiées par des méthodes complémentaires, dont plusieurs exemples ont été donnés dans le chapitre II, et au cours de l'acquisition du diagramme. Ainsi le pas d'acquisition doit être compatible avec la largeur à mi-hauteur des réflexions. Sept points d'acquisition par réflexion sont recommandés pour pouvoir faire une résolution complète. De même l'intensité et surtout le rapport signal sur bruit sont importants. La statistique de comptage doit alors être adaptée en fonction de l'échantillon analysé. Cette statistique de comptage σ est proportionnelle à la racine carrée du nombre de photons émis N et donc du temps de comptage t :

$$\sigma(N) = \sqrt{N} \propto \sqrt{t} \quad (\text{VI-40})$$

Elle doit être adaptée en fonction de l'erreur relative nette entre signal N_{sig} et bruit de fond N_{bkgd} sur un point i du diagramme pour que celle-ci soit la plus faible possible.

$$\varepsilon_i = \frac{100 \sqrt{N_i^{\text{sig}} + N_i^{\text{bkgd}}}}{\sqrt{N_i^{\text{sig}} - N_i^{\text{bkgd}}}} \quad (\text{VI-41})$$

Dans la mesure du possible, les pics les plus faibles doivent être au moins deux fois plus intenses que le bruit de fond, surtout aux petits angles, et ce afin de faciliter l'indexation.

D2. Positionnement et intensité des réflexions

Cette étape, déterminante pour la suite, doit permettre de définir le maximum de réflexions afin d'indexer le diagramme par la suite. Plusieurs programmes possèdent une fonction semi-automatique permettant la recherche de réflexions, dont TOPAS et WinPLOTR utilisés ici [Roisnel & Rodriguez-Carvajal, 2000; Coelho, 2009]. Cette fonction est généralement basée sur la recherche des minima de

la dérivée seconde du signal, mais des pics peuvent être ajoutés manuellement. Une fonction de simulation de profil peut ensuite être appliquée si nécessaire afin d'affiner la position de ces pics. Le recouvrement important des réflexions, particulièrement dans le cas des mailles monoclinique ou triclinique, peut rendre cette étape particulièrement difficile. Un changement de paramétrage de l'appareil, de diffractomètre ou de longueur d'onde peut permettre de résoudre certains de ces problèmes.

D3. Recherche bibliographique

La troisième étape, souvent couplée à la deuxième, consiste à vérifier les informations disponibles sur chacun des diagrammes et de les comparer à celles des phases supposées dans des bases de données ou directement dans les publications associées. Si cette étape est concluante et que la structure est entièrement ou partiellement décrite, elle pourra servir de structure modèle pour l'affinement final. Si seuls les paramètres de maille sont donnés, ils pourront être affinés après vérification. Sinon ils devront être déterminés directement à partir des réflexions identifiées.

D4. Recherche des paramètres de maille

Les paramètres de maille sont déterminés par indexation automatique des réflexions identifiées précédemment, les indexations manuelles n'étant possibles que pour des mailles de très haute symétrie. Généralement, une indexation efficace peut se baser sur vingt réflexions correctement définies. Trois méthodes d'indexation sont particulièrement utilisées, suivant les logiciels utilisés :

- La méthode semi-exhaustive (programmes LSI, [Coelho, 2003]) procède par essai-erreur en attribuant des indices aux petits angles puis en résolvant les équations linéaires reliant chaque raie à la suivante.
- La méthode Monte Carlo (McMaille, [Le Bail, 2004]) génère aléatoirement des mailles puis compare la position des raies avec celles observées.
- La méthode par dichotomie (DicVol06, [Boultif & Louër, 2004]) procède par variation des paramètres de maille par pas constant entre deux valeurs minimale et maximale. Le domaine est déterminé par dichotomie, si toutes les raies se trouvent entre les deux valeurs extrêmes de $Q = 2\pi/d_{hkl}$ le domaine est divisé en sous domaines qui seront analysés.

Les différentes méthodes, ne fonctionnant pas sur les mêmes algorithmes, sont complémentaires. Les programmes DicVol06, implémentés dans WinPLOTTR, et LSI, disponibles dans TOPAS, ont été utilisés parallèlement au cours de ces travaux de thèse afin de choisir plus efficacement parmi les

différentes solutions proposées par chacun. Le choix se base en particulier sur les facteurs de mérite, de de Wolff et de Smith, de chacune des solutions ainsi que sur l'indexation optimale des profils.

D5. Décomposition du profil

Une première analyse complète du profil peut être effectuée en se basant sur les paramètres de maille déterminés précédemment et en les affinant. Le but de cette procédure est de trouver le meilleur accord possible entre le profil observé et un profil calculé. Pour cela le diagramme est décomposé suivant la maille considérée et chaque pic du diagramme est simulé à l'aide de fonctions types.

La première méthode de décomposition du profil, « *pattern matching* », développée par Pawley afin d'analyser des diagrammes de diffraction des neutrons sur poudre fut généralisée et améliorée par Le Bail aux diagrammes de diffraction des rayons X [Pawley, 1981; Le Bail *et al.*, 1988]. Chaque position des réflexions est déterminée par les paramètres de maille obtenus précédemment. Les calculs des intensités totales $y_{tot\ calc}$ se font par des paramètres libres, c'est-à-dire sans modèle structural, pour chaque réflexion k et ce pour tout point x_i du diagramme.

$$y_{tot\ calc}(x_i) = y_{bkgd}(x_i) + \sum_k I_{calc}(k) \cdot W(i, k) \quad (VI-42)$$

avec y_{bkgd} l'intensité du fond continu en x_i , $I_{calc}(k)$ l'intensité intégrée de la k -ième réflexion intervenant en x_i et $W(i, k)$ la fonction de profil de la raie k en x_i .

Les intensités de chaque raie k sont affinées à chaque itération par l'algorithme de Le Bail, calculées d'après la formule de décomposition de Rietveld (VI-43), pour intégrer le plus favorablement possible le diagramme observé.

$$I_{obs}(k) = \sum_i \left[(y_{obs}(i) \cdot W(i, k) \cdot I_{calc}(k)) / \sum_k W(i, k) \cdot I_{calc}(k) \right] \quad (VI-43)$$

Dans cette formule : - $y_{obs}(i)$ représente l'intensité observée au point $2\theta(i)$ ou x_i .

- $y_{calc}(i)$ l'intensité calculée par (VI-44):

$$y_{calc}(i) = \sum_k W(i, k) \cdot I_{calc}(k) \quad (VI-44)$$

avec $I_{calc}(k) = F_{calc}^2(k)$ pour la réflexion k .

- $W(i, k)$ les corrections apportées au profil de raie

$$W(i, k) = S \cdot J(k) \cdot LP(k) \cdot \Omega(i, k) \quad (\text{VI-45})$$

avec S le facteur d'échelle

$J(k)$ la multiplicité de la réflexion k

$LP(k)$ le facteur de Lorentz Polarization

$\Omega(i, k) = \Omega(2\theta_i - 2\theta_k)$ la fonction de profil en i pour k .

La récurrence est apportée par l'injection de la valeur $I_{obs}(p, k)$ obtenue à l'étape p comme $I_{calc}(p + 1, k)$ à l'étape suivante. Le jeu de données initiales de $|F|$ est défini arbitrairement comme ayant toutes la même valeur. Les $|F_{obs}|$ sont alors calculés et injectés.

L'affinement étant réalisé par minimisation des moindres carrés (équation (VI-46)) :

$$\Delta = \sum_i w_i \cdot [y_{obs}(i) - y_{calc}(i)]^2 \quad (\text{VI-46})$$

w_i est un facteur de pondération pouvant varier suivant les logiciels utilisés mais généralement égal à $w_i = 1/\sigma_i^2$ avec σ^2 la variance de $y_{i obs}$ soit $\sigma_i = \sqrt{y_i}$ donc $w_i = 1/y_{i obs}$.

Outre les paramètres de maille, cette approche permet d'affiner le zéro du diagramme, le profil de raies (largeur, asymétrie), leur intensité et le fond continu.

Ces étapes ne procédant que par affinement de valeurs initiales, il est important de bien définir ces valeurs. Ainsi les paramètres de maille et les valeurs de profil provenant du diffractomètre utilisé doivent avoir été déterminés le plus finement possible en utilisant les étapes précédentes.

Chaque paramètre peut ensuite être affiné en utilisant des logiciels tels que FullProf ou Jana2006. L'ordre d'affinement peut avoir une importance majeure, au risque de faire diverger la résolution. Au cours des analyses réalisées dans ce chapitre, les intensités des réflexions (facteur d'échelle) ont généralement été affinées en premier, puis le fond continu et le zéro du diagramme, les paramètres de maille et enfin les profils de raies (largeur à mi-hauteur puis asymétrie). Cet ordre a pu être modifié

suivant les résultats observés sur le diagramme après chaque étape.

Une fois la décomposition du profil achevée, après convergence des facteurs d'accord, le groupe d'espace est déterminé en se basant sur les conditions d'extinction systématique. Cette approche peut être automatique ou effectuée directement sur le diagramme par comparaison entre les réflexions attendues et observées. Une série d'extinctions récurrentes peut indiquer un groupe d'espace possible à tester en priorité. A noter que tout groupe d'espace n'ont pas les mêmes occurrences, le groupe d'espace $P2_1/c$ étant par exemple sur-représenté dans les structures référencées, notamment dans la Cambridge Structural Database (34,8%, 237 368/682 999 au 6 janvier 2014) [Cambridge Structural Database, 2014].

Cette étape de décomposition du profil est très importante pour valider le modèle obtenu dans les étapes précédentes. De bons facteurs d'accord, la vraisemblance des paramètres affinés et l'analyse de la courbe différence peuvent indiquer si le modèle convient pour la suite de la détermination. Il est à noter que les facteurs de profil obtenus ont ces valeurs minimales au cours de cette étape. Si la décomposition est optimale, ces valeurs ne pourront qu'être égalées par la suite, et non améliorées. L'utilisation d'un modèle structural peut en effet réduire la « qualité » de l'affinement, mais celui-ci y gagne en sens physique.

D6. Détermination d'un modèle structural

Toutes les étapes réalisées jusqu'à présent n'ont pas utilisé de modèle structural, les affinements étant effectués sur la base des paramètres de l'échantillon (paramètres de maille notamment) ou de l'équipement utilisé (longueur d'onde, géométrie, asymétrie). Pour espérer obtenir un modèle structural vraisemblable, il est nécessaire d'avoir analysé toutes ces contributions affectant l'intensité. Une fois toutes les contributions expérimentale et intrinsèque au cristal identifiées, elles peuvent être généralement modélisées afin d'identifier les contributions propres à la structure. L'étape suivante consiste à obtenir un modèle de structure approximatif. Les intensités observées sont donc analysées afin d'obtenir ce modèle.

Méthode de résolution

Le diagramme de diffraction des rayons X d'un cristal peut donc être déterminé à partir de la structure, et réciproquement les positions atomiques, et donc la structure complète, peuvent être théoriquement intégralement retrouvées à partir du module du facteur de forme. Cette deuxième étape est cependant rendue difficile par la perte d'une partie du signal. Seule l'amplitude du facteur de structure, son module $|F_{hkl}|$, est mesurée. Or, F_{hkl} est un nombre complexe possédant une phase

$\exp [2\pi i(kx_j + ky_j + lz_j)]$ entièrement dépendante des positions atomiques. Cette phase, contenant une grande partie de l'information structurale est donc perdue lors de la mesure, conduisant au problème de phase de la résolution structurale. La résolution d'une structure cristalline repose donc sur la résolution de ce problème de phase par l'obtention d'un modèle structural conduisant à cette phase (figure VI-4).

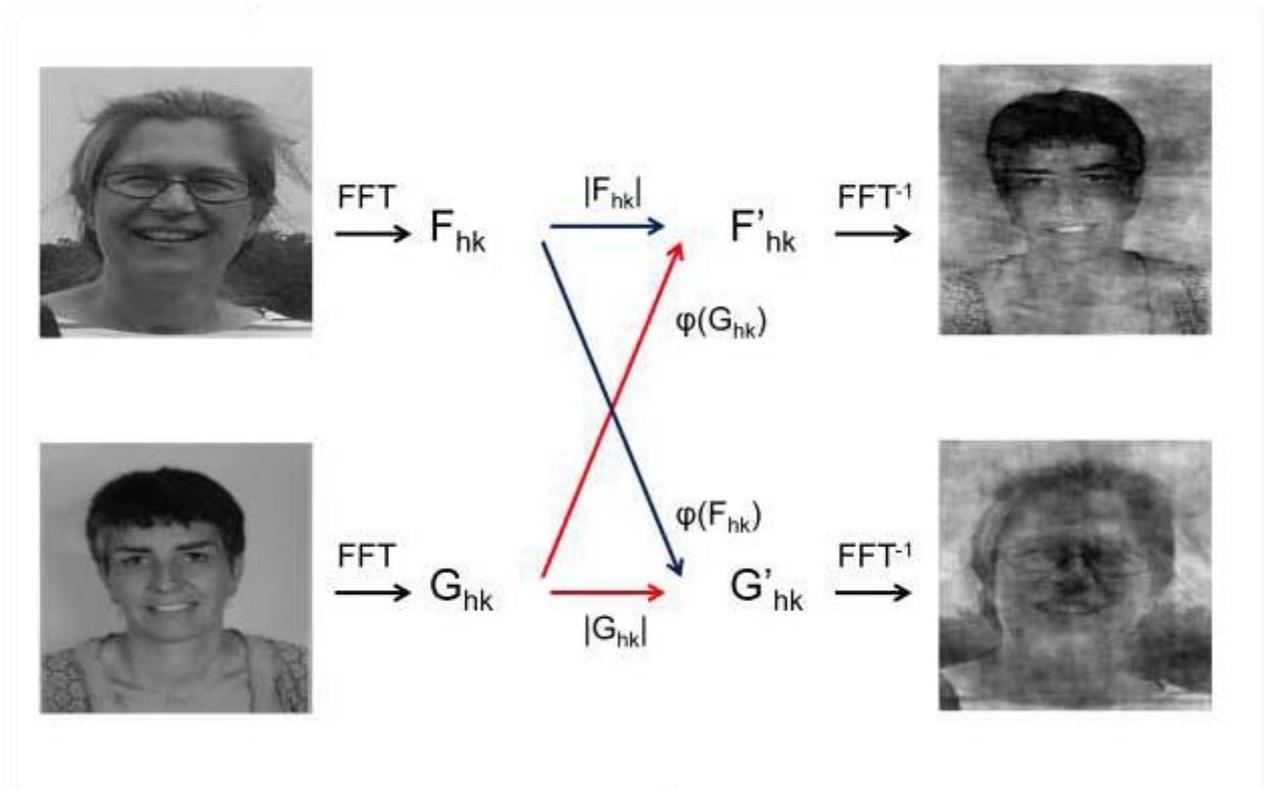


Figure VI-4 : Transformée de Fourier de deux images avec inversion de la phase φ et de l'amplitude $|F|$ entre chaque image. La phase représente l'information de contraste, la perte de la phase compliquant l'interprétation du signal.

Pour cela plusieurs méthodes sont envisageables suivant les atomes en présence. Elles se basent pour la plupart sur l'estimation de la densité électronique ρ , toujours positive et dont les maxima représentent les positions atomiques probables.

- La méthode de Patterson et la méthode de l'atome lourd combinent le positionnement des atomes lourds et la résolution des positions des atomes restant par rapport à ces atomes. La fonction de Patterson représente la transformée de Fourier de s intensités, et non de s facteurs de structure, directement accessibles par la mesure. Les vecteurs positions entre deux atomes de la maille, représentés par cette fonction, peuvent ainsi être facilement déterminés, sans connaissance du placement absolu de ces atomes. La fonction de Patterson est très sensible aux atomes lourds et permet ainsi leurs placements relatifs. Elle est cependant inefficace pour les atomes légers. Ces atomes

peuvent être cependant déduits en analysant la carte de Fourier-différence, la phase du facteur de structure global étant prise comme égale à celle de ou des atomes lourds. La méthode de Patterson fut utilisée à travers le logiciel Jana2006, la faible différence dans le nombre d'électrons des atomes considérés ne permettant pas une analyse complète. Le critère $\sum_{at\ lourd} Z^2 / \sum_{at\ léger} Z^2 > 1$ n'est pas respecté dans le cas des phases de pyrophosphate de calcium hydraté étudiées au cours de cette thèse.

- Les méthodes directes utilisent plusieurs relations entre les densités électroniques, nécessitant la nature des atomes constituant la maille, pour estimer les positions atomiques dans l'unité asymétrique. Elles se basent notamment sur la détermination d'une probabilité sur le signe du facteur de structure par les inégalités de Harper-Kasper et par la relation Σ_1 qui en découle. L'équation de Sayre permet par la suite, à partir d'un nombre limité de facteur de structure, de retrouver le signe de nombreux facteurs associés. Ces relations ne fonctionnent cependant que pour des atomes ayant des facteurs de diffusion proches et faibles. Dans une majorité des cas, seul un nombre restreint d'atomes peut être positionné dans la maille. Les atomes manquant peuvent ensuite être obtenus en les localisant par Fourier –différence où :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V_c} \sum_{hkl} (F_{hkl}(obs) - F_{hkl}(calc)) \exp [2\pi i(kx + ky + lz)] \quad (VI-47)$$

Ces méthodes sont implémentées dans les logiciels Expo2009 et SHELXL utilisés lors de ces travaux de thèse. Elle a permis le positionnement des atomes les plus lourds, calcium et phosphore, ainsi que certains oxygènes sans aboutir à une structure complète.

- L'algorithme de « *charge flipping* » repose sur la seule hypothèse de la positivité de la densité électronique. A chaque facteur de structure F_{hkl} est associée une phase aléatoire ϕ_{hkl} , la phase étant nulle (réel positif) pour les réflexions non observées. La densité électronique ρ est alors calculée à partir de ce jeu de données. Cette densité peut être nulle par endroit, à cause du choix aléatoire de la phase. Les signes sont alors changés pour ces valeurs et le module de la densité est conservé. Un nouveau jeu de facteurs de structure G_{hkl} est alors calculé par transformée de Fourier de la densité positive. Les phases de F_{hkl} sont alors assignées à F_{hkl} avec les mêmes conditions que dans l'étape initiale. Puis l'itération est poursuivie jusqu'à la convergence. Cette convergence est cependant non démontrée mathématiquement. Cet algorithme a été utilisé à travers Superflip, fourni dans Jana2006, le succès de cet algorithme étant relatif [Petricek *et al.*, 2006]. Lors de nos différentes résolutions de structure, l'algorithme ne convergait en un temps acceptable que rarement vers une solution. Lors de

la convergence, la résolution de structure ne prenait cependant que quelques secondes. La position des atomes lourds était obtenue à chaque routine. Le programme Superflip permet une vérification *a posteriori* du groupe d'espace.

- Le recuit simulé est la dernière méthode utilisée au cours de ces travaux. Elle n'est basée sur aucune hypothèse concernant la densité électronique et ne repose que sur des facteurs d'accord entre les diagrammes simulés et calculés (dérivés du facteur de profil R_{wp} ou du facteur de Bragg R_{Bragg}). Les positions atomiques sont définies aléatoirement ou sur la base d'un modèle défini par les méthodes précédentes. A chaque cycle les positions sont changées de manière aléatoire dans la structure et le critère de convergence est vérifié : si $R_{wp\ i+1} < R_{wp\ i}$ l'algorithme est poursuivi avec la nouvelle structure et si $R_{wp\ i+1} > R_{wp\ i}$ les positions sont conservées avec une probabilité $P = \exp[-(R_{wp\ i+1} - R_{wp\ i})/K]$, K est une valeur décroissante associée à la « température » d'un système lors d'un recuit, diminuant jusqu'à un minimum « d'énergie » de la structure. Le critère de convergence de K peut renseigner sur l'obtention d'un minimum local ou global. Ainsi la probabilité d'acceptation d'une structure permet de sortir d'un minimum local. Si la structure $i+1$ est rejetée, la structure i est conservée et le cycle est recommencé. Ces méthodes sont relativement lentes, toutes les configurations devant être analysées. Une structure initiale proche, issue des méthodes précédentes, et des contraintes physiques, de longueur de liaison ou d'angle de configuration moléculaire, peuvent être introduites dans la résolution afin d'obtenir une convergence plus rapide. Le temps de traitement est plus long que les méthodes précédentes mais une solution acceptable fut obtenue pour chacun des cas étudiés dans ces travaux à partir de solutions partielles fournies par les autres méthodes. Elle est essentielle pour le traitement des données de diffraction des neutrons et le placement des atomes d'hydrogène. Dans notre cas, cette méthode fut utilisée à travers le logiciel TOPAS [Coelho, 2009].

La fonction Fourier-différence fut utilisée sur chaque solution obtenue par les différentes méthodes. Il est utile de rappeler que pour toutes les méthodes, le traitement du signal en amont est essentiel à l'obtention d'une solution vraisemblable.

D7. Affinement structural : Méthode de Rietveld

Le modèle structural obtenu est finalement affiné par la méthode de Rietveld afin d'obtenir la structure cristalline la plus proche possible de celle de l'échantillon [Rietveld, 1969]. Cette étape nécessite obligatoirement un modèle, les paramètres affinés devant déjà être les plus proches possibles de la solution afin de ne pas diverger.

La précision atteinte par l'analyse Rietveld est en théorie suffisante pour obtenir une structure

complète, hydrogène compris, à partir d'un diagramme sur poudre de bonne qualité. Ce diagramme doit cependant posséder une résolution spatiale suffisante avec un rapport signal sur bruit correct à grand angle et une absence de recouvrement aux petits angles. L'affinement reposera sur l'équation (VI-1) de l'intensité calculée et la récurrence se fera par réduction des moindres carrés par rapport au diagramme observé.

L'intensité des réflexions calculées pour chaque point i du diagramme n'est plus définie par un facteur de structure arbitraire comme dans la méthode de Le Bail mais par celui issu du modèle structurel établi précédemment suivant l'équation :

$$\begin{aligned}
 y_{tot\ calc}(x_i) &= y_{bkgd}(x_i) + \sum_{\varphi} \sum_k W(i, k) \cdot I_{calc}(k) \\
 &= y_{bkgd}(x_i) + \sum_{\varphi=1}^{N_{\varphi}} S_{\varphi} \sum_{k=1}^K J_{\varphi k} \cdot LP(\theta_k) \cdot A_{\varphi k} \cdot \mu_{\varphi k} \cdot O_{\varphi k} \cdot \Omega_{\varphi}(i, k) \cdot |F_{\varphi k}|^2
 \end{aligned}
 \tag{VI-48}$$

où y_{bkgd} représente l'intensité du fond continu en x_i ou $2\theta_i$, N_{φ} le nombre de phases cristallines φ dans l'échantillon et K le nombre de réflexions contribuant à l'intensité au point i . Les autres paramètres découlent de ceux de l'équation (VI-1) et des corrections apportées sur le facteur de profil.

S_{φ} est le facteur d'échelle de la phase φ .

$LP(\theta_k)$ le facteur Lorentz-Polarisation regroupant les deux termes dépendant du monochromateur utilisé.

$A_{\varphi k}$ la fonction d'asymétrie de la raie k de φ en x_i .

$\mu_{\varphi k}$ la correction d'absorption de la raie k de φ en x_i .

$O_{\varphi k}$ la contribution de l'orientation préférentielle à l'intensité de la raie k de φ en x_i .

$\Omega(i, k)$ la fonction profil de la raie k de φ en x_i .

$F_{\varphi k}$ le facteur de structure de la raie k de φ donné par l'équation (VI-3) reproduite ici :

$$F_{\phi k} = \sum_j N_j \cdot f_j \cdot \exp\left(-\frac{B_j \sin^2 \theta_{hkl}}{\lambda^2}\right) \cdot \exp[2\pi i(kx_j + ky_j + lz_j)] \quad (\text{VI-49})$$

Cette équation est établie dans le cas général d'un échantillon constitué de plusieurs phases. Dans notre cas $N_\phi = 1$ car les échantillons étudiés sont considérés comme étant constitués d'une seule phase pure, les échantillons analysés ayant été vérifiés grâce à plusieurs techniques de caractérisation (cf. Chapitre II).

De même que lors de l'utilisation de la méthode de Le Bail, le facteur d'échelle, le fond continu, le zéro, les paramètres de maille et les paramètres du profil utilisé (largeur à mi-hauteur et asymétrie) seront affinés, dans cet ordre généralement. Les valeurs obtenues lors de l'affinement précédant, par la méthode de Le Bail, sont alors réintroduites afin de correspondre au mieux au profil observé. De trop grandes déviations pourront indiquer un modèle structural faux ou trop éloigné. Les positions atomiques puis les agitations thermiques seront finalement affinées.

Les affinements Rietveld seront réalisés sur Jana2006 et FullProf [Rodríguez-Carvajal, 2001; Petricek *et al.*, 2006]. Le logiciel Topas sera utilisé dans l'analyse combinée de diagramme de diffraction X et neutrons tandis que FullProf sera utilisé pour des fonctions spécifiques, ce logiciel possédant la plus grande flexibilité.

Le modèle structural ainsi affiné possède une densité électronique compatible avec le diagramme observé permettant de situer finement les différents atomes présents dans la structure, suivant les valeurs et les formes de cette densité. Cette structure, si elle est vraisemblable, correspond ainsi à la structure de la phase cristalline analysée.

D8. Densité électronique et théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)

La densité électronique obtenue expérimentalement peut être comparée à une densité électronique théorique, correspondant à un état d'énergie minimale. L'énergie du système peut en effet être décrite comme une fonctionnelle, une fonction, de la densité électronique de ce même système au travers de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT).

La DFT décrit les propriétés de l'état fondamental d'un système comme entièrement données par la densité électronique. Ainsi seule la valeur du potentiel extérieur, pouvant être généré par les autres ions du réseau, affectant la densité électronique d'un système, est nécessaire et suffisante pour

déterminer l'état fondamental. Instinctivement, la description des placements des différents atomes et de leurs cortèges électroniques est nécessaire et suffisante pour décrire le comportement de la matière à l'échelle du cristal [Hohenberg & Kohn, 1964; Levy, 1979].

Les propriétés du système sont plus particulièrement calculées à partir de la minimisation de l'énergie de ce système. L'énergie minimale du système est liée à une densité électronique particulière, correspondant à la densité électronique exacte de l'état fondamental. Il est ainsi possible par minimisation, ou affinement, de l'énergie d'un système cristallin donné de prévoir théoriquement les propriétés du solide. De même, à partir d'un système donné d'atomes et de leurs positions approximées, il est possible de déterminer une structure théorique associée à une énergie minimale et ainsi modéliser une structure cristalline théorique.

Nous utiliserons ici la modélisation *ab initio* basée sur la DFT pour modéliser les structures obtenues expérimentalement. Cette modélisation permettra de vérifier la vraisemblance de la structure expérimentale, par occupation d'un minimum d'énergie théorique, et réciproquement de valider le modèle *ab initio* obtenu qui pourra être utilisé par la suite pour prévoir les propriétés de la phase cristalline. Cependant, toutes ces propriétés seront calculées sur l'état fondamental, statique et à 0 K.

Etude physico-chimique et structurale de pyrophosphates de calcium hydratés : application aux micro-calcifications associées à l'arthrose

Ce mémoire porte sur l'étude de pyrophosphates de calcium hydratés (CPP : $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), composés rencontrés dans des micro-calcifications pathologiques associées à l'arthrose et, dans certains cas, responsables d'arthropathie destructive. Ces cristaux, présents dans les articulations de patients arthritiques, possèdent un fort potentiel inflammatoire susceptible d'engendrer une dégradation aigüe du cartilage. Cependant, les mécanismes de formation des phases de CPP et d'activation de leur potentiel inflammatoire n'ont pas encore été entièrement décrits. Nous nous sommes intéressés à l'étude des conditions de formation des différentes phases de pyrophosphates de calcium hydratés *in vitro* ainsi qu'à la caractérisation fine de chacune des phases d'intérêt biologique avec des outils de laboratoire et de grands instruments afin de mieux comprendre leurs propriétés physico-chimiques et d'améliorer leur identification *in vitro* et *in vivo*.

Dans un premier temps, un protocole de synthèse a été établi permettant la synthèse de quantités importantes de chacune des phases pures de CPP (CPP amorphe, CPP dihydratés monoclinique et triclinique et CPP tétrahydraté). Les conditions de synthèse associées à la formation de chacune de ces phases, pH et température notamment, ont été explorées. Des échantillons purs ont été utilisés comme références pour les différentes études physico-chimiques et structurales qui ont ensuite été menées. Les échantillons de référence ont été caractérisés finement, d'un point de vue structural avec notamment la résolution de plusieurs structures cristallines (diffraction des rayons X et des neutrons, sur poudre et monocristal) mais aussi au travers de différentes analyses spectroscopiques (spectroscopies FTIR et Raman, RMN du solide) et d'analyses de la morphologie des cristaux (microscopies électroniques à balayage et en transmission, diffraction électronique). Chacune de ces analyses complémentaires, couplées à des modélisations *ab initio*, a permis de préciser les hypothèses suggérant un rôle de la surface des cristaux dans le potentiel inflammatoire de ces phases. Une troisième partie est consacrée à l'exploration de différentes techniques de synthèse mettant en œuvre différents milieux (cristallisation en solution et en gel). Ces expériences ont permis d'établir des comparaisons avec les processus de formation observés *in vivo* et d'évolution *in vitro* à haute température des phases de CPP. Finalement des études *ex vivo* de cartilages calcifiés seront présentées, mettant en évidence les avantages de ces techniques de caractérisation de laboratoire comme outils de diagnostic.

Ce travail permet ainsi de préciser les mécanismes physico-chimiques liés aux différentes phases de CPP *in vitro* et *in vivo* afin de mieux comprendre la formation de ces phases et leur potentiel inflammatoire associé, tout en améliorant les possibilités de diagnostic des arthropathies microcristallines.

Physico-chemical and structural study of hydrated calcium pyrophosphates: application to microcalcifications associated with arthritis

The present work concerns the study of hydrated calcium pyrophosphates (CPP: $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), a group of phases detected in pathological microcalcifications and associated with arthritis. These crystals are frequently observed in the synovial fluid of arthritic patients and they were described as having a high inflammatory potential which could induce a severe degradation of cartilage. However, the mechanisms involved in the formation of the CPP crystals and the activation of their inflammatory potential are not fully understood. This work is focused on the study of the synthesis conditions of CPP *in vitro* and on the fine characterization of CPP phases of biological interest using laboratory equipments and large-scale facilities. The aim of this work was to describe the physico-chemical properties of these materials, including inflammatory potential, and to improve their identification *in vivo* and *in vitro*.

First, a synthesis protocol was designed for the production of significant amounts of pure samples for each of the CPP phases (amorphous CPP, monoclinic and triclinic dihydrated CPP and tetrahydrated CPP). Different conditions, including pH and temperature, were studied to achieve the synthesis of reference materials. These samples were precisely characterized using complementary techniques to determine their crystalline structures (powder and single crystal X-ray diffraction and neutron diffraction) as well as using spectroscopic (FTIR and Raman spectroscopies, MAS-NMR) and morphologic analyses (SEM, TEM and electron diffraction). These analyses, combined with *ab initio* modeling, clarified the hypotheses concerning the role of the crystal surface on the adsorption properties of CPP crystals and their inflammatory potential. The third part of this thesis is focused on the study of CPP synthesis conditions, by using different experimental setups to study crystallization in solution and in gel. A comparison with *in vivo* formation processes and *in vitro* high temperature evolution phenomena of these phases was established based on the results of these experiments. Finally, *ex vivo* analyses of pathological cartilage are presented, highlighting the advantages of different laboratory characterizations as medical diagnostic tools.

This work contributes to clarify the physico-chemical characteristics of CPP phases *in vitro* and *in vivo*, to improve the knowledge on the formation and the evolution of these phases, their properties including inflammatory potential, and to facilitate their identification *in vivo*.