



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 11681

To link to this article : doi:10.1016/j.crpv.2004.07.003
URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.crpv.2004.07.003>

<p>To cite this version : Cazalbou, Sophie and Eichert, Diane and Drouet, Christophe and Combes, Christèle and Rey, Christian Biological mineralizations based on calcium phosphates. (2004) Comptes Rendus Palevol, vol. 3 (n° 6-7). pp. 563-572. ISSN 1631-0683</p>
--

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

Paléontologie générale (Paléobiochimie)

Minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium

Sophie Cazalbou, Diane Eichert, Christophe Drouet,
Christèle Combes, Christian Rey *

*Cirimat, École nationale supérieure des ingénieurs en arts chimiques et technologiques, 118, route de Narbonne,
31077 Toulouse cedex, France*

Résumé

Les fractions minérales des os et des dents sont constituées d'apatites non stœchiométriques, dont la morphologie, la taille cristalline, la composition et la réactivité sont adaptées à la fonction biologique des tissus. Les apatites des os sont des nanocristaux très réactifs, ayant à leur surface une couche hydratée responsable de leurs propriétés biologiques. Cette couche instable se transforme progressivement et inéluctablement en apatite relativement inerte. En dépit d'échelles de temps très différentes, les principes qui déterminent l'évolution biologique et diagénétique du minéral osseux sont les mêmes, notamment dans les processus impliquant une dissolution–re-précipitation. *Pour citer cet article : S. Cazalbou et al., C. R. Palevol 3 (2004).*

Abstract

Biological mineralisations based on calcium phosphate. The mineral fractions of bones and teeth are non-stoichiometric apatite crystals. Their morphology, dimensions, composition and reactivity are adapted to their biological function. Bone apatites are made of very reactive nanocrystals possessing, on their surface, a structured hydrated layer responsible for their biological properties. This unstable layer becomes progressively and unavoidably transformed into a relatively inert apatite lattice. In spite of very different time periods, the laws that determine the biological and diagenetic evolution of bone mineral are the same, especially in processes involving dissolution–re-precipitation phenomena. *To cite this article: S. Cazalbou et al., C. R. Palevol 3 (2004).*

Abridged English version

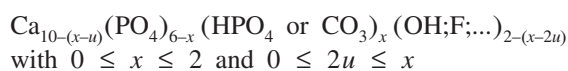
Generally considered as inert, the mineral of hard tissues appears in fact as a very reactive and sophisticated material. The composition, the crystal size, crys-

tal orientation and surface properties all contribute to adapting the tissue to its biological functions. The various modes of formation, dissolution and evolution of apatite are utilised to reach specific properties.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : christian.rey@ensiacet.fr (C. Rey).

All biological mineralisations based on apatitic calcium phosphate can be represented by the following chemical formula [19]:



in which $(x - u)$ cationic vacancies and $(x - 2u)$ monovalent anionic vacancies coexist. The u parameter appears generally very small and it can be neglected [19]. Two types of carbonate ions are present located on the trivalent and monovalent anionic sites of the structure [27]. For bone and dentine, the proportion of cationic vacancies is very high and close to the maximum, whereas it is very low for dental enamel [10].

Nanocrystalline apatites precipitate easily in aqueous solutions and their wide domain of formation is probably related to their widespread occurrence in living organisms. Nascent apatite crystals from any origin (tooth enamel, bone, cartilage, fish scales, synthetic apatites) show similar characteristics [25,28–31]. Their composition reveals a very high content in cationic and monovalent anionic vacancies (x close to 2), a low amount of carbonate and a high concentration of HPO_4^{2-} ions. One of the main characteristics of freshly formed apatites is the existence of non-apatitic environments of the mineral ions, as revealed by several spectroscopic techniques [2,26,27,32,35] (Figs. 1 and 2). These ions belong to a hydrated layer on the crystal surface and recent data indicate that the characteristic spectroscopic features of the non-apatitic environment are deeply affected by drying [9]. Although it shows similarities with hydrated calcium phosphate salts, the hydrated layer seems to correspond to a specific organisation.

The non-apatitic environments determine the evolution of the apatite nanocrystals. They are less stable than the apatitic domains and, on aging in aqueous solutions, they progressively disappear as the apatitic domain grows [31]. This maturation process contributes to determine the final composition of the crystals. The loosely bound ions of the hydrated surface layer can be easily and reversibly exchanged by ions from the solution and this layer also affects the adsorption properties of the biological crystals, which vary according to the maturation stage.

Maturation, ion exchange and adsorption are involved in the dynamic behaviour of apatitic biominerals. Although similar at an early stage, differences between

biological deposits appear during their development and determine the adaptation to the tissue function (Fig. 3). For dental enamel, which must resist abrasion and acid etching, the mineral fraction progressively increases as the organic matrix that organised and controlled its growth is destroyed. Simultaneously, the size of the crystals increases and their composition gets closer to stoichiometry. The number of vacancies decreases, improving crystal cohesion and stability. All crystals exhibit a needle-like shape elongated along the c axis of the hexagonal unit cell. The common orientation of these needles perpendicular to the enamel surface favours the close packing of crystals and their re-mineralisation from saliva.

For bone, providing mechanical resistance and acting as a primitive ion reservoir are two crucial functions. They are obtained through a tissue organisation involving apatite nanocrystals with a very high specific surface area and a well-developed hydrated layer responsible for ion exchanges with body fluids and homeostasis. Bone mineral also interacts with several organic matrix constituents and probably participates in complex regulation processes involving signalling molecules, in addition to its mechanical role in association with the collagen matrix. However, the crystals formed first, rich in non-apatitic environments, inevitably evolve towards more stable, more inert forms and the original surface properties are lost. Although this process is slowed down by mineral ions that delay the re-structuring of the hydrated layer into apatite, the need for mineral renewal is crucial for many vertebrates. It is mainly obtained by remodelling of the tissue, which re-established its original properties. Remodelling is facilitated by the small size of the crystals, their large amount of vacancies and the tissue porosity that determines dissolution behaviour. During remodelling, part of the mineral ions is reused in the newly formed tissue. Each mineral ion has its own turnover rate, probably related to its effect on apatite solubility. Thus, fluoride or lead ions, which reduce apatite solubility, are particularly difficult to remove from bone mineral when they have been taken up [34], whereas other elements, like strontium, can be easily eliminated [3].

Despite very different time scales, the diagenetic alteration of bone mineral presents some analogies with biological evolution (Fig. 4). The first stage corresponds to the rapid and progressive elimination of non-apatitic environments. This process probably lasts

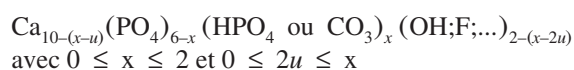
a few months but does not affect the apatitic cores. Two other slower physical-chemical mechanisms are involved: chemical evolution, driven by the thermodynamic stability of apatites, and leading to less soluble apatites generally incorporating increasing amounts of fluoride and heavy elements (Pb, Ba) with time, and Ostwald ripening, driven by the decrease of surface energy, which favours the growth of large crystals at the expenses of the small ones. A biological mechanism involving dissolution-re-precipitation phenomena by microorganisms is also active and can produce nascent apatite crystals able to experience a new cycle of physical-chemical evolution. In dissolution-re-precipitation processes, the original composition of the mineral may be strongly modified, although the ions locally dissolved may re-precipitate, like in remodeling. Globally, the physical-chemical evolution predominates, and an improvement of the crystallinity and an increase of the amount of stabilising ions are observed. Although it is obviously illusory to expect to find unaltered crystals in fossil bone, the extent of diagenetic changes may vary strongly according to the tissue type. Generally, denser tissues will be less affected and in these tissues major constituents or their isotopes have more chance of being preserved by mass effect. Trace elements on the contrary can be largely modified [12] in conjunction with their effect on apatite solubility.

The biological and diagenetic evolution of bone follows the same processes. The physical-chemical evolution towards more stable, less soluble apatites is determined by the surrounding fluids. It can be periodically interrupted due to biological activity with partial re-utilisation of the original constitutive ions.

1. Introduction

Généralement considéré comme un composant quasi-inerte, le minéral des tissus durs des vertébrés révèle en fait une réactivité et une sophistication assez exceptionnelles, déterminées par ses caractéristiques physico-chimiques intrinsèques et par l'adaptation biologique des organes minéralisés à leurs diverses fonctions. Les études de la partie minérale des tissus durs des vertébrés ont été assez déroutantes pour les premiers chercheurs. L'identification d'une structure de type apatitique a été effectuée très tôt, par diffraction

des rayons X [8], dans les os et dans l'émail dentaire ; cependant, la composition chimique a rapidement révélé une grande variabilité. Les trois composants majeurs (calcium, phosphate et carbonate) ont été rapidement identifiés, mais ils présentaient des proportions variables selon la nature, la localisation, l'âge ou le type de tissu, contrairement au carbonate de calcium, l'autre grand biominéral des tissus durs, dont la composition reste invariable. Très tôt, il a été admis qu'il devait exister, dans les tissus durs des vertébrés, deux phases : une phase apatitique cristallisée et une phase carbonatée, en proportions variables [23]. Il fallut attendre les années 1970 et les études faites sur les apatites carbonatées de synthèse [16,18], pour que la véritable nature du minéral soit approchée. Toutes les minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium peuvent être représentées par la formule chimique suivante [19] :



dans laquelle il existe des lacunes cationiques ($x - u$) et des lacunes anioniques ($x - 2u$) sur les sites monovalents. Le paramètre u est généralement très faible et peut être négligé dans le cas des apatites biologiques [19]. Des études détaillées mettent en évidence l'existence de différents types de carbonate sur différents sites anioniques (trivalent et monovalent) de la maille apatitique [27] et il est établi que la teneur en carbonate dans le minéral osseux croît avec l'âge des vertébrés [19,24]. Pour l'os et la dentine, la proportion de lacunes cationiques est très élevée et proche du maximum. Dans le cas de l'émail dentaire, au contraire, les proportions de lacunes et le taux d'anions bivalents sont beaucoup plus faibles, avec une proportion plus importante d'ions carbonate sur les sites anioniques monovalents [11,28]. Toutefois, une autre caractéristique des apatites biologiques a très tôt été révélée, la capacité d'échanger certains ions de la surface minérale [21]. Cette caractéristique, ainsi que d'autres aspects spectraux et structuraux, sont attribués à l'existence d'un précurseur, généralement un phosphate amorphe, qui évolue progressivement vers une phase apatitique [33]. Il faudra attendre plusieurs années pour que soit établie de manière irréfutable l'absence de phase amorphe en proportion détectable dans la phase apatitique des tissus durs des vertébrés [14]. Parallèlement, d'autres études suggèrent que les différentes caracté-

ristiques des apatites biologiques, notamment leur morphologie cristalline, puissent être interprétées en considérant l'existence d'un phosphate octocalcique (OCP) [4], dont la structure est très proche de celle des apatites et qui possède la propriété de s'hydrolyser en apatite sans changement de morphologie cristalline. Actuellement, les analyses des caractéristiques structurales et spectroscopiques permettent d'exclure l'existence de phase cristallisée étrangère détectable, et le minéral serait constitué d'une seule phase apatitique nanocristalline [13]. Toutefois, les nanocristaux d'apatite présentent des propriétés assez exceptionnelles et le but de cette mise au point est précisément de décrire ces propriétés et les caractéristiques structurales particulières qui leur sont associées, de préciser comment ces caractéristiques sont utilisées par les organismes vivants et d'envisager leurs conséquences sur l'évolution des os fossiles.

2. Synthèse d'apatites nanocristallines, analogies avec les apatites biologiques

Les minéralisations biologiques et le minéral des os, en particulier, apparaissent généralement très hétérogènes du point de vue de la composition chimique, la taille cristalline et certaines de leurs propriétés telles que la dissolution [1]. Par ailleurs, les dimensions nanométriques des cristaux (à l'exception toutefois des cristaux de l'émail dentaire), leur étroite association avec une matrice organique, rendent l'étude directe difficile et ouvrent la voie à des interprétations faiblement étayées. La plupart des progrès réalisés dans la connaissance des minéralisations biologiques ont eu pour moteur l'étude de composés de synthèse modèles [10]. Ces composés se révèlent en outre nécessaires pour l'étude dynamique des équilibres et des réactions impliquant le minéral. La synthèse d'apatites nanocristallines est particulièrement facile et peut se produire par précipitation directe ou par hydrolyse d'autres phosphates de calcium dans des domaines de concentration ionique, de température et de pH assez larges, contrairement à la préparation de certains phosphates de calcium, notamment l'OCP, dont les conditions de formation et de stabilité sont beaucoup plus étroites [6]. Cette facilité de formation est certainement une des raisons du succès de ce biominéral, qui permet en outre la régulation de trois composants essentiels des

systèmes biologiques : le calcium, les ions phosphate et les ions carbonate, mais aussi probablement d'autres éléments tels que le magnésium par exemple. La méthode de synthèse des apatites nanocristallines la plus fréquemment adoptée est la double décomposition entre une solution d'un sel soluble de calcium et d'un sel soluble de phosphate et de carbonate [6,31]. La solution de calcium est versée dans la solution d'ions phosphate et carbonate. L'excès de ces ions permet de tamponner la solution à un pH physiologique sans addition d'éléments étrangers. Le premier précipité formé est une apatite nanocristalline très semblable au minéral osseux. Les diagrammes de diffraction des rayons X sont identiques et ne montrent qu'une seule phase cristallisée. La morphologie, la taille des cristaux et leur composition chimique sont très proches de celles des minéralisations biologiques au tout début du processus de minéralisation de la matrice organique [31]. Ces cristaux présentent des caractéristiques structurales originales qui méritent une description détaillée.

3. Caractéristiques des nanocristaux d'apatite

L'une des caractéristiques essentielles des nanocristaux d'apatite fraîchement formés, quelle que soit leur origine (biologique ou synthétique), est la présence d'environnements ioniques spécifiques des ions minéraux, détectables par diverses méthodes spectroscopiques telles que la spectroscopie infrarouge (IR) [26,27], la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire appliquée aux solides (RMN) [2,32,35] ou la spectroscopie d'absorption des rayons X au voisinage du seuil d'absorption des éléments (XANES). Toutes ces méthodes mettent en évidence, en plus de l'existence d'environnements ioniques majoritaires caractéristiques de la structure apatitique, d'autres types d'environnements ioniques détectables uniquement dans les nanocristaux (Fig. 1). Ces environnements ioniques particuliers sont appelés « environnements non apatitiques ». Ils ont été associés à des couches ioniques hydratées de surface, particulièrement abondantes dans les nanocristaux d'apatite fraîchement précipités.

Pour des raisons de commodité, la plupart des études effectuées sur ces apatites mal cristallisées ont porté sur des tissus biologiques ou des précipités lyophilisés. Des études récentes montrent que les caracté-

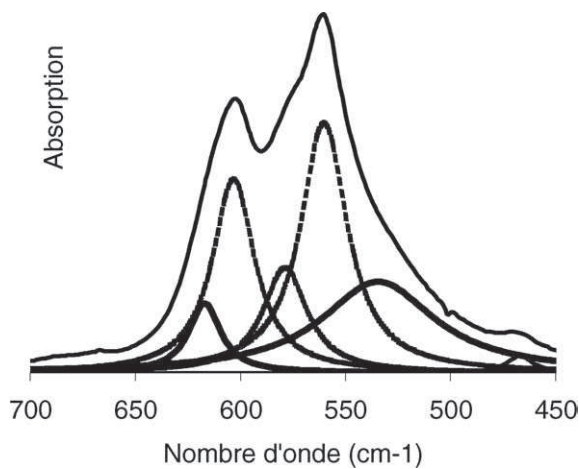


Fig. 1. Exemple de spectre infrarouge dans le domaine d'absorption ν_4 des groupements PO_4 , montrant les environnements « non apatitiques » (bandes en trait gras à 534 et 617 cm^{-1}) et apatitiques (bandes en pointillés à 600, 580 et 560 cm^{-1}).

Fig. 1. Example of infrared spectrum in the ν_4 absorption domain of PO_4 groups, showing the 'non-apatitic' (block bands at 534 and 617 cm^{-1}) and apatitic environments (dotted bands at 600, 580, and 560 cm^{-1}).

ristiques spectroscopiques des environnements non apatitiques sont en fait profondément modifiées par séchage, quelle que soit la méthode utilisée [9]. Les spectres obtenus sur des cristaux humides présentent des pics non apatitiques beaucoup plus fins et mieux définis que ceux observés sur les cristaux lyophilisés. Ces pics, bien que pouvant présenter des analogies avec ceux de phosphates de calcium hydratés, notamment le DCPD (phosphate dicalcique dihydraté ou brushite) et l'OCP, ne correspondent à aucun de ces composés bien cristallisés. Ces études mettent en évidence l'existence de structures hydratées fragiles à la surface des nanocristaux, qui témoignent probablement du mode de formation de ces cristaux en solution à partir d'ions isolés ou de *clusters* hydratés (Fig. 2). La persistance de ces structures pourrait être liée à la diminution de l'énergie interfaciale en milieu aqueux. En effet, les phosphates hydratés présentent généralement des énergies interfaciales beaucoup plus faibles que les apatites [20]. Il semble donc que les environnements non apatitiques mis en évidence sur les nanocristaux lyophilisés soient en fait le résultat d'une altération de couches hydratées de surface beaucoup mieux structurées.

La composition des cristaux est hétérogène. La couche hydratée est essentiellement constituée d'ions bi-

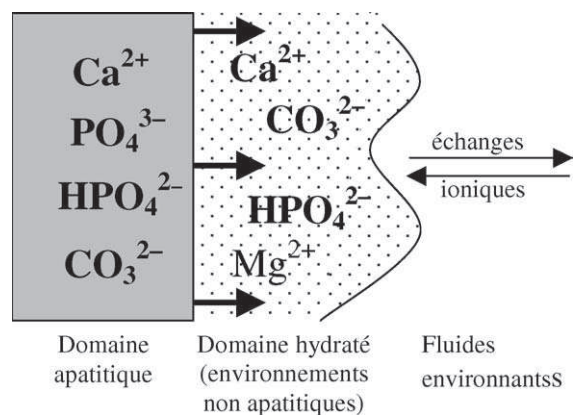


Fig. 2. Schéma représentant la constitution des nanocristaux d'apatite biologique. La couche hydratée réduit l'énergie de surface des cristaux et alimente la croissance, lente, des domaines apatitiques. Les possibilités de substitution ionique sont plus larges dans la couche hydratée que dans le domaine apatitique.

Fig. 2. Sketch showing the structure of biological apatite nanocrystals. The hydrated sheet reduces the surface energy of crystals and feeds the slow growth of apatitic domains. Possibilities of ionic substitution are higher in the hydrated sheets than in the apatitic domain.

valents (Ca^{2+} , HPO_4^{2-} et CO_3^{2-}) et les domaines apatitiques et carbonatés sont assez éloignés de la stœchiométrie, bien qu'il soit actuellement impossible de connaître avec précision la composition de ces domaines. Le taux de carbonatation croît avec l'âge du précipité [31].

Les environnements non apatitiques ont été mis en évidence dans de nombreuses minéralisations biologiques (émail dentaire, os, cartilage, écailles de poisson) [25,28,29]. Ils sont généralement plus abondants au début des processus de minéralisation [30]. L'existence de ces environnements entraîne quelques conséquences sur les propriétés physico-chimiques des minéralisations biologiques qui sont utilisées par les organismes vivants.

4. Propriétés physico-chimiques

Les environnements non apatitiques des premiers précipités sont thermodynamiquement moins stables que la phase apatitique et on observe, lors du vieillissement des suspensions aqueuses d'apatites nanocristallines, une progressive diminution relative des domaines non apatitiques [27]. Il a été démontré que les

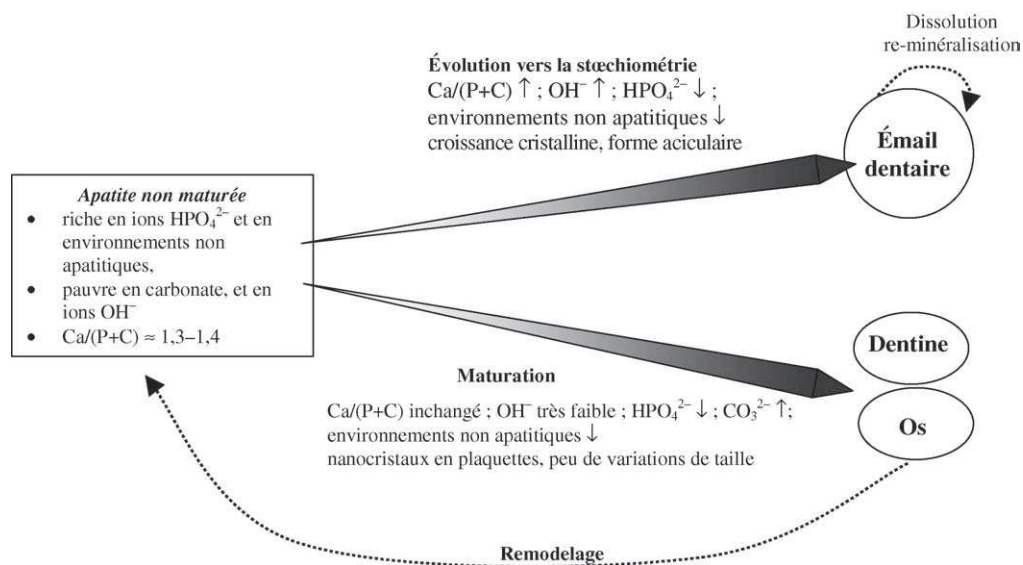


Fig. 3. Schéma de l'évolution physico-chimique des minéralisations biologiques in vivo.
 Fig. 3. Sketch of the physical-chemical evolution of in vivo biological mineralisations.

apatites de synthèse évoluaient avec le temps d'une manière tout à fait analogue au minéral osseux [31] (Fig. 3). Les premiers précipités formés contiennent dans tous les cas très peu d'ions carbonate. Ces derniers s'incorporent d'abord à la couche hydratée, puis aux domaines apatitiques en croissance. Dans un milieu riche en ions carbonate, la maturation est associée à une diminution de la proportion d'ions hydrogénophosphate, et on n'observe globalement aucune variation de la stœchiométrie de la phase apatitique. Toutefois, un second type de maturation, dans des milieux pauvres en ions carbonate, conduit à des apatites qui tendent vers la stœchiométrie [31]. Ce second processus semble mis en œuvre dans le développement de l'émail dentaire et permet d'obtenir des apatites moins lacunaires, plus résistantes aux attaques acides. Ainsi, la maîtrise de la concentration locale des fluides biologiques en ions carbonate permet aux organismes vivants de contrôler la stœchiométrie de la phase apatitique et sa solubilité. Ce minéral peut donc s'adapter à des fonctions biologiques très différentes.

La deuxième caractéristique importante des apatites nanocristallines est leur propriété d'échange ionique. Cette propriété, liée essentiellement à la présence de la couche hydratée, n'affecte que marginalement les domaines apatitiques. Ainsi, il a été montré que la capa-

cité d'échange des apatites précipitées décroît rapidement avec le temps de maturation [31]. Les ions relativement mobiles de la couche de surface sont impliqués dans des équilibres complexes avec la solution, encore mal connus, et qui semblent dépendre de l'état de maturation. En ce qui concerne les ions bivalents, les équilibres peuvent être décrits par une réaction d'échange ionique entre le solide et la solution, qui touche les anions aussi bien que les cations, et qui n'affecte, ni la structure cristalline, ni les dimensions des cristallites. Les substitutions possibles semblent plus nombreuses que pour le réseau apatitique ; ainsi, les ions Mg^{2+} , qui ne se substituent que très difficilement aux ions Ca^{2+} à l'intérieur de la structure, peuvent facilement remplacer le calcium dans la couche hydratée [5]. Les échanges ioniques sont très rapides (l'équilibre est atteint en quelques minutes) et réversibles. Cependant, certains ions de la couche hydratée peuvent se fixer dans les domaines apatitiques au cours de la maturation : l'échange devient alors progressivement irréversible [5]. C'est ce qui se passe, par exemple, avec les ions strontium ou carbonate. D'autres ions comme le magnésium sont cantonnés à la couche hydratée et restent majoritairement échangeables, quel que soit le temps de maturation. Ces réactions sont probablement très impliquées dans l'homéostasie, une des fonctions majeures du minéral osseux. Une autre

conséquence des échanges ioniques impliquant la couche hydratée concerne les intoxications par des éléments aptes à se fixer sur le minéral.

La surface des nanocristaux détermine également les interactions avec la matrice organique. Il a été établi que les propriétés d'adsorption étaient étroitement liées à l'état de maturation. Ainsi, l'affinité semble croître avec le temps de maturation, alors que le nombre de sites d'adsorption diminue [22]. L'augmentation de l'affinité semble compatible avec l'augmentation de l'énergie interfaciale due à la maturation. Sur le plan biologique, les variations des propriétés interfaciales pourraient être liées aux propriétés mécaniques, mais elles pourraient aussi permettre de réguler les concentrations de certaines protéines spécifiques du tissu osseux et probablement le remodelage osseux, bien qu'aucun travail n'ait jusqu'à présent démontré ces effets [30].

5. Dynamique du minéral dans les organismes vivants

Les tout premiers dépôts minéraux d'apatite dans différents tissus biologiques sont étonnamment proches, du point de vue de leur composition chimique et de leur structure, des premiers cristaux obtenus par synthèse. D'importantes différences apparaissent au cours du développement et répondent à la nécessaire adaptation du tissu à sa fonction (Fig. 3). Dans l'émail dentaire, qui doit résister à l'abrasion et aux attaques acides, la fraction minérale croît progressivement aux dépens de la matrice organique, qui organise et contrôle sa croissance. Parallèlement, la taille des cristaux augmente considérablement et leur composition s'écarte de celle du minéral osseux et des premiers cristaux. Notamment, le nombre de lacunes cationiques diminue, accroissant ainsi la cohésion cristalline et la stabilité de la structure. À la fin de sa formation, l'émail est constitué de cristaux aciculaires orientés parallèlement. L'axe c de la maille hexagonale de l'apatite est perpendiculaire à la surface de l'émail. Cette direction, qui correspond à la vitesse de croissance maximale des cristaux d'apatite facilite certainement la reminéralisation de l'émail par la salive. Chez certaines espèces, l'émail est constitué de fluorapatite pratiquement stœchiométrique, l'une des apatites les plus insolubles [17].

Dans le cas de l'os, au contraire, les propriétés de résistance mécanique et celle, plus primitive, de réservoir d'ions sont essentielles. Elles sont assurées notamment grâce aux nanocristaux d'apatite, de surface spécifique très élevée, et dont la couche hydratée superficielle détermine les échanges avec les fluides biologiques et l'interaction avec la matrice organique. Toutefois, les premiers précipités sont métastables et évoluent inexorablement vers des formes plus stables et plus insolubles, dans lesquelles le minéral perd une grande partie de sa réactivité superficielle. Ce processus est ralenti par divers ions qui se localisent dans la couche hydratée et qui gênent sa restructuration en apatite, notamment les ions Mg^{2+} et CO_3^{2-} . Il est également probable que des protéines adsorbées à la surface du minéral pourraient jouer le même rôle. Un autre processus de régénération de la couche hydratée pourrait être son renouvellement quotidien lié aux variations circadiennes des ions calcium et phosphate. Cependant, le processus essentiel reste le remodelage osseux, qui conduit à un renouvellement périodique de tout le tissu et rétablit les propriétés d'un minéral fraîchement formé. La dissolution du minéral est facilitée par la petite taille des cristaux, leur écart à la stœchiométrie, qui diminue la cohésion cristalline, et la porosité du tissu. Le remodelage s'effectue avec des vitesses très différentes selon les tissus ; par exemple, le renouvellement d'un os spongieux, aux épiphyses d'un os long, est plus rapide que celui de la partie diaphysaire corticale. Le minéral du tissu est donc très hétérogène et l'os spongieux des épiphyses, qui est aussi le mieux irrigué par le sang, est généralement beaucoup plus riche en environnements non apatitiques et plus réactif que le minéral d'un os cortical. Cette accessibilité et cette réactivité expliquent la fixation préférentielle de certains éléments dans les zones épiphysaires (Sr, Pb, F...) [7], lors d'une intoxication ou d'un changement brutal dans l'alimentation. On sait aussi que le remodelage est beaucoup plus actif chez les êtres jeunes, et ceci explique la sensibilité particulière de jeunes enfants à diverses maladies, comme le saturnisme par exemple. Lors du remodelage, une partie des ions minéraux du minéral ancien est réutilisée pour former l'os nouveau mais chaque ion a ses propres caractéristiques de recyclage, probablement déterminées par leur effet sur la solubilité des apatites. Ainsi, les ions fluorure, qui donnent des apatites très insolubles, sont particulièrement difficiles à éliminer

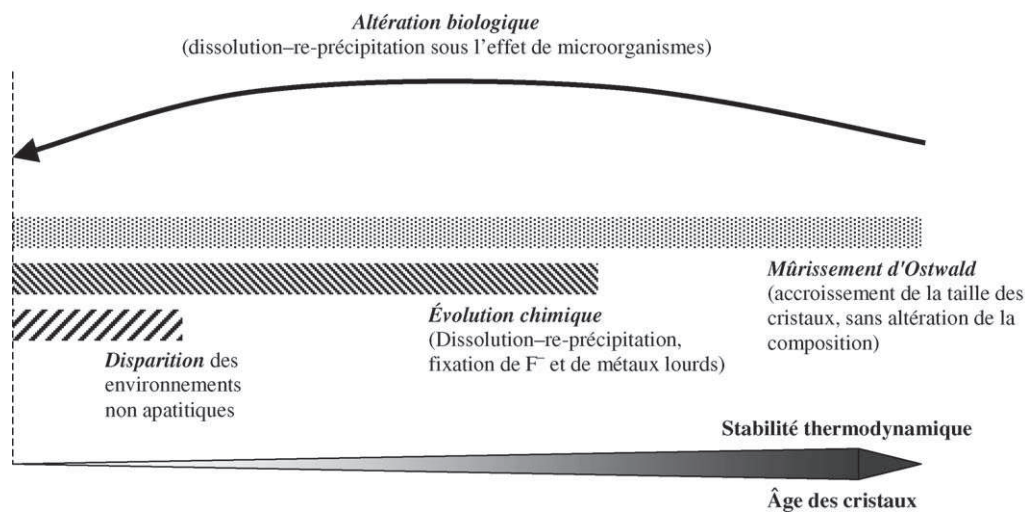


Fig. 4. Schéma de l'évolution diagénétique des minéralisations biologiques (fossilisation).
 Fig. 4. Sketch of the diagenetic evolution of biological mineralisations (fossilisation).

de l'os lorsqu'ils y sont entrés [34]. Il en est de même pour le plomb ; en revanche, d'autres éléments, comme Sr, peuvent être facilement éliminés [3]. Inversement, la stabilisation de la structure minérale induite par divers éléments ralentit les processus de remodelage.

6. Évolution diagénétique

Différents stades dans l'évolution diagénétique des minéralisations biologiques apatitiques peuvent être définis (Fig. 4). Le tout premier stade correspond à la disparition progressive des environnements non apatitiques. Ce temps de maturation peut être évalué à quelques mois, mais ce phénomène, très rapide, peut avoir pour conséquence la fixation sur le minéral de divers éléments de l'environnement immédiat. Ce processus ne conduit cependant pas à un remaniement profond du minéral, et les domaines apatitiques de cœur, en particulier, ne seraient pas altérés à ce stade. Il existe deux autres mécanismes, beaucoup plus lents, qui peuvent affecter beaucoup plus profondément l'ensemble de la structure. Le premier mécanisme est une évolution de la composition chimique. De nombreux éléments peuvent s'incorporer au réseau cristallin selon la composition locale des fluides, avec pour moteur la stabilité thermodynamique. Ainsi, on observe généralement une augmentation de la teneur en fluor et en éléments lourds, qui conduit à des apatites plus insolubles et plus stables. En revanche, les apatites restent

partiellement carbonatées, malgré les lacunes et les défauts de stabilité que la présence de carbonate implique. Il faut en fait considérer que l'évolution naturelle tend vers un équilibre solide-solution et, si les fluides locaux contiennent des ions carbonate, l'apatite en contiendra également. De plus, en raison de l'existence d'un large domaine de solutions solides, les équilibres peuvent ne concerner, dans un premier stade, que la surface des cristaux. Les mécanismes de restructuration plus profonds nécessitent, quant à eux, des processus de dissolution-re-précipitation plus lents. Le troisième phénomène est une maturation de type « mûrissement d'Ostwald », dont la force motrice est la diminution de l'énergie de surface. Ce mûrissement conduit à une dissolution des petits cristaux au profit des gros, plus stables. Enfin, un autre processus d'altération, particulièrement important puisqu'il se traduit par des phénomènes de dissolution-re-précipitation, est lié à l'activité de microorganismes (levures, bactéries). Contrairement aux processus physico-chimiques précédents, qui conduisent nécessairement à la formation d'un minéral plus stable, le processus biologique d'altération peut conduire à des précipités minéraux très instables et réactifs, susceptibles de commencer un nouveau cycle d'évolution physico-chimique déterminé par l'environnement immédiat. Ce processus est affecté par la stabilité du minéral et sa teneur en certains ions potentiellement toxiques pour les microorganismes, comme le fluor par exemple.

Les mécanismes de dissolution–re-précipitation peuvent conduire à une profonde altération du contenu de la maille minérale, bien que les ions libérés localement puissent être en partie réutilisés, comme dans le remodelage osseux. Globalement, les processus d'évolution physico-chimiques semblent dominer et on observe une amélioration de l'état cristallin dû à la croissance des dimensions moyennes des cristaux et à une plus grande perfection de la structure, ainsi que la fixation d'éléments étrangers stabilisant la structure apatitique, comme le fluor et probablement certains métaux lourds (Pb, Ba). L'uranium et ses dérivés ont également une affinité particulière pour la structure apatitique ; ils ont été utilisés pour la datation. Les altérations profondes du minéral étant toujours liées à la présence d'eau, on peut penser qu'elles dépendent notamment de la porosité des tissus. Il est ainsi généralement considéré que l'émail dentaire, en raison de la taille des cristallites d'apatite et de sa faible porosité, évolue peu. Le tissu osseux spongieux et les petits os seraient par ailleurs plus affectés que les os corticaux et gros dans lesquels la diffusion des fluides est plus lente et les taux de réutilisation d'ions dans les mécanismes de dissolution–re-précipitation sont également plus élevés. Les composants minéraux des tissus osseux fossiles sont aujourd'hui de plus en plus utilisés pour la datation ou pour des recherches plus fines, visant à déterminer, par exemple, les types d'alimentation. Il est certain, cependant, que, contrairement aux composants organiques résiduels, les apatites biologiques, par leur structure et la nature des cristallites, peuvent subir de profondes évolutions [15]. Il est probablement assez illusoire d'essayer de trouver du minéral non altéré dans un os fossilisé et il semble plus raisonnable d'essayer de préciser dans quelle proportion et dans quelle mesure l'évolution diagénétique risque de perturber les déterminations envisagées [12]. Globalement, les éléments les plus abondants du minéral sont ceux qui risquent le moins d'avoir été fortement altérés par des apports extérieurs, simplement par effet de masse, donc les mesures utilisant les ions (y compris les différentes substitutions isotopiques) Ca^{2+} , PO_4^{3-} , et dans une mesure probablement plus faible CO_3^{2-} , devraient être relativement fidèles. En revanche, les éléments en traces et les rapports isotopiques les impliquant peuvent être considérablement modifiés et il est donc préférable d'utiliser, dans ce cas, des tissus plus denses, avec de gros cristaux, comme l'émail dentaire. Certain-

es procédures courantes paraissent, par ailleurs, assez discutables. La dissolution acide, par exemple [12], couramment employée pour extraire les fractions altérées, paraît d'utilisation délicate ; en effet, si ce traitement dissout de préférence les parties superficielles les plus accessibles et les parties altérées sous l'effet des micro-organismes, elle peut aussi dissoudre des fractions peu altérées, nécessairement plus solubles que les fractions stabilisées par l'évolution diagénétique, de nature physico-chimique. De plus, cette méthode peut conduire à de fortes variations de pH dans le tissu et à une re-précipitation.

Malgré des échelles de temps très différentes, l'évolution diagénétique des os et leur évolution biologique présentent des similarités. En raison de sa réactivité, le minéral osseux, qui s'altère progressivement dans un organisme vivant, est nécessairement modifié après la mort. Le remodelage biologique, comme l'évolution diagénétique, s'effectue avec une réutilisation partielle des ions minéraux, déterminée par la stabilité thermodynamique et l'abondance locale des éléments chimiques.

Références

- [1] A.A. Baig, J.L. Fox, Z. Wang, W.I. Higuchi, S.C. Miller, A.M. Barry, M. Otsuka, Metastable solubility equilibrium behavior of bone mineral, *Calcif. Tissue Int.* 64 (1999) 329–339.
- [2] K. Beshah, C. Rey, M.J. Glimcher, M. Shimizu, R.G. Griffin, Solid state carbon-13 and proton NMR studies of carbonate containing calcium phosphates and enamel, *J. Solid-State Chem.* 84 (1990) 71–81.
- [3] G. Boivin, P. Deloffre, B. Perrat, G. Panczer, M. Boudeulle, Y. Murras, P. Allain, Y. Tsouderos, P.-J. Meunier, Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration, *J. Bone Miner. Res.* 11 (1996) 1302–1311.
- [4] W.E. Brown, Crystal growth of bone mineral, *Clin. Orthop.* 44 (1966) 205–220.
- [5] S. Cazalbou, Échanges cationiques impliquant des apatites nanocristallines analogues au minéral osseux, thèse, INP, Toulouse, 2000.
- [6] S. Cazalbou, V. Midy, A. Tofighi, D. Lee, M. Dard, C. Rey, Nanocrystalline apatites for bone reconstruction, *MRS Symp. Proc.* 599 (2000) 39–44.
- [7] S.G. Dahl, P. Allain, P.-J. Marie, Y. Murras, G. Boivin, P. Ammann, Y. Tsouderos, P.D. Delmas, C. Christiansen, Incorporation and distribution of strontium in bone, *Bone* 28 (2001) 446–453.
- [8] W.F. De Jong, The mineral substance in bones, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 45 (1926) 445–448.

- [9] D. Eichert, Étude de la réactivité de surface d'apatites de synthèse nanocristallines, thèse, INP, Toulouse, 2001.
- [10] J.C. Elliott, Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- [11] J.C. Elliott, D.W. Holcomb, R.W. Young, Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel, *Calcif. Tissue Int.* 37 (1985) 372–375.
- [12] A. Fabig, B. Herrmann, Trace elements in buried human bones: intra-population variability of Sr/Ca and Ba/Ca ratios—diet or diagenesis? *Naturwissenschaften* 89 (2002) 115–119.
- [13] M.J. Glimcher, The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification, in: F.L. Coe, M.J. Favus (Eds.), Disorders of Bone and Mineral Metabolism, Raven Press, New York, 1992, pp. 265–286.
- [14] M. Grynopas, L.C. Bonar, M.J. Glimcher, Failure to detect an amorphous calcium–phosphate solid phase in bone mineral: a radial distribution function study, *Calcif. Tissue Int.* 36 (1984) 291–301.
- [15] M.J. Kohn, M.J. Schoeninger, W.W. Baker, Altered states: effect of diagenesis on fossil tooth chemistry, *Geochim. Cosmochim. Acta* 63 (1999) 2737–2747.
- [16] J.-C. Labarthe, G. Bonel, G. Montel, Sur la structure et les propriétés des apatites carbonatées de type B phosphocalciques, *Ann. Chim.* 8 (1973) 289–301.
- [17] R.Z. LeGeros, S. Suga, Crystallographic nature of fluoride in enameloids of fish, *Calcif. Tissue Int.* 32 (1980) 169–174.
- [18] R.Z. LeGeros, O.R. Trautz, J.-P. LeGeros, E. Klein, Carbonate substitution in the apatitic structure, *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1968) 1712–1718 (n° spécial).
- [19] R. Legros, Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés, thèse d'État, INP, Toulouse, 1978.
- [20] G.H. Nancollas, W. Wu, R. Tang, The control of mineralization on natural and implant surfaces, *MRS Symp. Proc.* 599 (2000) 99–108.
- [21] W.F. Neuman, T.Y. Toribara, B.J. Mulryan, The surface chemistry of bone, carbonate–phosphate exchange, *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 4263–4266.
- [22] S. Ouizat, A. Barroug, A. Legrouri, C. Rey, Adsorption of bovine serum albumin on poorly crystalline apatite: influence of maturation, *Mat. Res. Bull.* 34 (2000) 2279–2289.
- [23] E.D. Pellegrino, R.M. Blitz, Bone carbonate and the double salt hypothesis: its chemical, physical and physiological implications, *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 76 (1965) 181–191.
- [24] E.D. Pellegrino, R.M. Blitz, Mineralization in the chick's embryo. I: Monohydrogen phosphate and carbonate relationship during maturation of the bone crystal complex, *Calcif. Tissue Int.* 10 (1972) 128–135.
- [25] C. Rey, J. Lian, M. Grynopas, F. Shapiro, L. Zylberberg, M.J. Glimcher, Non-apatitic environments in bone mineral: FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states, *Connect. Tissue Res.* 21 (1989) 267–273.
- [26] C. Rey, B. Collins, M. Shimizu, M.J. Glimcher, Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopic study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age. I: Investigation in the ν_4 PO_4 domain, *Calcif. Tissue Int.* 46 (1990) 384–394.
- [27] C. Rey, V. Renugopalakrishnan, B. Collins, M.J. Glimcher, Fourier transform infrared spectroscopy study of the carbonate ions in bone mineral during aging, *Calcif. Tissue Int.* 49 (1991) 251–258.
- [28] C. Rey, V. Renugopalakrishnan, B. Collins, M.J. Glimcher, A resolution-enhanced infrared spectroscopy study of the environment of the CO_3^{2-} ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation, *Calcif. Tissue Int.* 49 (1991) 259–268.
- [29] C. Rey, K. Beshah, R. Griffin, M.J. Glimcher, Structural studies of the mineral phase of calcifying cartilage, *J. Bone Miner. Res.* 6 (1991) 515–525.
- [30] C. Rey, E. Strawich, M.J. Glimcher, Non-apatitic environments in Ca–P biominerals. Implications in reactivity of the mineral phase and its interactions with the organic matrix constituents, *Bull. Inst. Océanogr. Monaco* 14 (1994) 55–64 (special issue).
- [31] C. Rey, A. Hina, A. Tofighi, M.J. Glimcher, Maturation of poorly crystalline apatites: chemical and structural aspects in vivo and in vitro, *Cells Mater.* 5 (1995) 345–356.
- [32] A.H. Roufosse, W.P. Aue, J.E. Roberts, M.J. Glimcher, R.G. Griffin, Investigation of the mineral phases of bone by solid-state phosphorus-31 magic-angle spinning nuclear magnetic resonance, *Biochemistry* 23 (1984) 6115–6120.
- [33] J.D. Termine, A.S. Posner, Amorphous/crystalline interrelationships in bone mineral, *Calcif. Tissue Res.* 6 (1966) 335–342.
- [34] C.H. Turner, G. Boivin, P.-J. Meunier, A mathematical model for fluoride uptake by the skeleton, *Calcif. Tissue Int.* 52 (1993) 130–138.
- [35] Y. Wu, M.J. Glimcher, C. Rey, J. Ackerman, A unique protonated phosphate group in bone mineral not present in synthetic calcium phosphates, *J. Mol. Biol.* 244 (1994) 423–435.