

DISPUTANDA

La nature de la substance minérale de l'os¹Par H. BRASSEUR, M. J. DALLEMAGNE et J. MELON², Liège

On ne peut discuter la question de la nature chimique de la substance minérale de l'os sans définir nettement sa position en ce qui concerne le problème tant débattu du phosphate tricalcique.

1^o Nous avons démontré antérieurement l'existence d'un sel de formule $[Ca_3(PO_4)_2]_3 \cdot H_2(OH)_2$ et nous l'avons appelé phosphate tricalcique α . Cette dénomination a été critiquée récemment par BRANDENBERGER et SCHINZ³. Comme ces auteurs le font remarquer, le phosphate α , dans l'acception de TRÖMEL⁴, est une forme de $Ca_3(PO_4)_2$ stable à une température supérieure à 1400° C, alors que le phosphate β possède cette même qualité au-dessous de cette température. En utilisant un autre mode d'expression, nous ne faisons que suivre la suggestion de BREDIG, FRANCK et FULDNER⁵ se conformant à une tradition cristallographique ancienne. Ces auteurs déclarent: «Le phosphate tricalcique pur (KAHLBAUM *pro analysi*) donne un radiogramme analogue à celui de la fluorapatite. La phase correspondante est appelée phase α . Il s'agit non de $Ca_3(PO_4)_2$, mais d'une substance semblable à l'apatite et contenant de l'eau de cristallisation». Ajoutons que dans l'esprit de ces auteurs, ce produit est totalement différent de l'hydroxylapatite. Il est certes regrettable que les cristallographes et les céramistes utilisent quelquefois les mêmes lettres grecques pour désigner des formes différentes, comme c'est le cas pour les phosphates aussi bien que pour les diverses formes de la silice. Jusqu'à ce qu'un accord intervienne, il ne paraît pas qu'une dénomination ait plus de raison d'être qu'une autre, et pour éviter toute confusion, nous continuerons à appeler phosphate tricalcique α le produit obtenu par précipitation en milieu aqueux et dont la formule est $[Ca_3(PO_4)_2]_3 \cdot H_2(OH)_2$.

2^o Un deuxième point sur lequel nous ne sommes pas d'accord avec BRANDENBERGER et SCHINZ est précisément l'existence de ce sel hydraté. Dans leur publication³, ces auteurs déclarent en effet: «Zunächst von-einander abweichende Deutungen der experimentellen Befunde haben schließlich zu einer einheitlichen Auffassung im Sinne der zunächst von G. TRÖMEL⁴ gegebenen geführt: darnach bildet sich bei der Fällung

von Ca -Salzlösungen mit Alkalilösungen nicht, wie früher immer angenommen, tertiäres Ca -Phosphat $Ca_3(PO_4)_2$, sondern stets ein basisches Salz $Ca_{10}(PO_4)_6 \cdot (OH)_2$, nämlich der Hydroxylapatit; ferner ist $Ca_3(PO_4)_2$ in wässrigem Medium überhaupt unbeständig und geht durch Hydrolyse immer in den Hydroxylapatit über, was auch bei den übrigen sauren Ca -Phosphaten zutrifft.» D'après TRÖMEL, comme d'après BRANDENBERGER et SCHINZ, le précipité qu'on obtient en mettant en présence 3 moles de $Ca(OH)_2$ et 2 moles de H_3PO_4 n'est pas $Ca_3(PO_4)_2$, mais un sel basique «à savoir l'hydroxylapatite. De plus, $Ca_3(PO_4)_2$ est instable en milieu aqueux, ce qui se présente également pour les autres sels de calcium.»

Cette conclusion est infirmée par nos expériences d'après lesquelles le sel ayant comme formule $Ca_3(PO_4)_2$ (phosphate tricalcique β) est très stable en milieu aqueux et peut même être conservé dans l'eau plusieurs semaines à la température ordinaire sans subir de transformation se marquant par une modification du radiogramme. Au surplus, BREDIG, FRANCK et FULDNER¹ ont constaté que le phosphate tricalcique β se transforme en phosphate α par l'ébullition dans l'eau.

D'après nos résultats, le précipité qu'on obtient en milieu aqueux n'est ni $Ca_3(PO_4)_2$, ni une hydroxylapatite $[Ca_3(PO_4)_2]_3 \cdot Ca(OH)_2$, mais $[Ca_3(PO_4)_2]_3 \cdot H_2(OH)_2$ (phosphate tricalcique α). Nous rendant compte de ce que toutes les discussions relatives à ce sel proviennent des difficultés de l'obtenir à l'état parfaitement pur, nous avons réalisé une série de précipités dans des conditions différentes pour mettre clairement en évidence les caractères des produits obtenus et définir la nature des impuretés tendant à dénaturer le phosphate tertiaire.

Nous réalisons 6 précipités avec déficit, égalité ou excès stoechiométrique du cation Ca^{++} par rapport à l'anion PO_4^{3-} en utilisant (dans environ 3000 cm³ d'eau pour 20 mM d'acide phosphorique ou de phosphate) les réactifs dont la nature et les proportions sont indiquées au tableau. Celui-ci rassemble également les résultats des examens de ces précipités qui sont isolés et lavés environ 30 minutes après le mélange des réactifs: radiogramme, indice de réfraction ordinaire (I. R.), aspect en lumière normale et polarisée avant et après calcination à 900° C et rapport Ca/P indiqué par l'analyse chimique.

L'examen du tableau permet de tirer des conclusions très importantes. Tous ces précipités sont constitués de

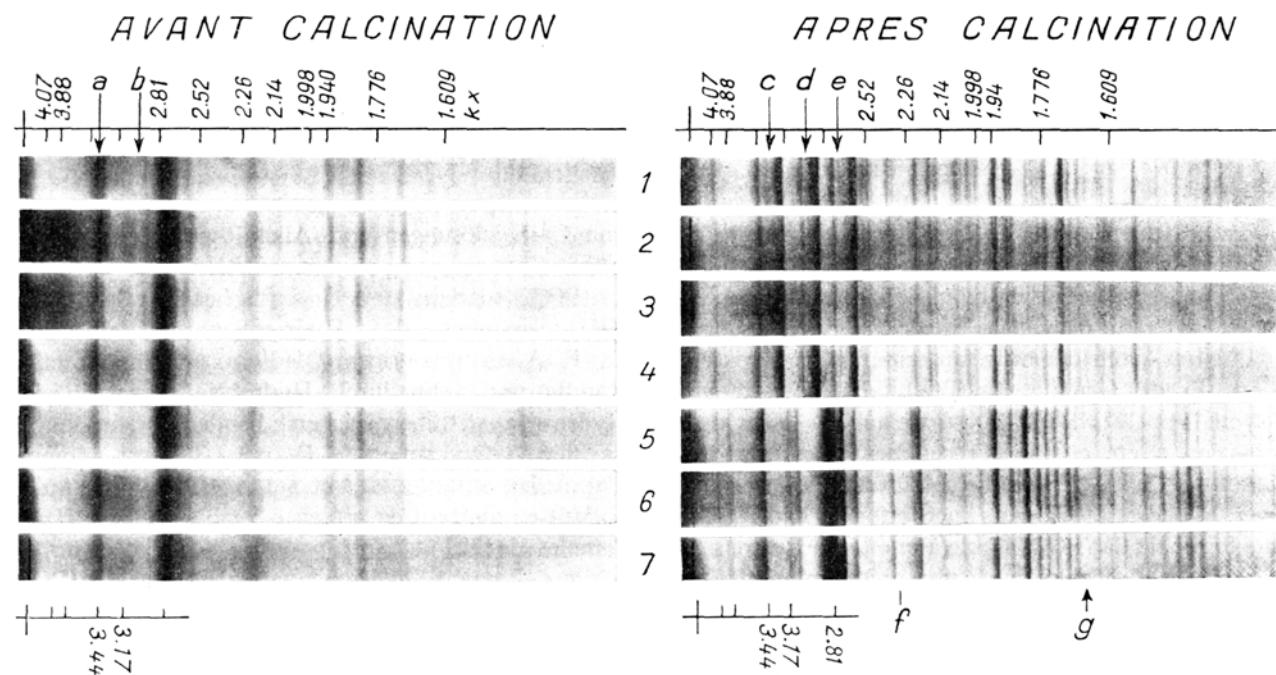
¹ Réponse à une note de E. BRANDENBERGER et H. R. SCHINZ, *Exper.* 4, 59 (1948).

² UNIVERSITÉ DE LIÈGE, Laboratoire d'application des rayons X, Laboratoire de biochimie de l'Institut supérieur d'éducation physique et Institut de minéralogie et de cristallographie.

³ E. BRANDENBERGER et H. R. SCHINZ, *Helv. medica acta (A)*, 12, Suppl. XVI (1945).

⁴ G. TRÖMEL, *Z. physik. Chem.* 158, 422 (1932).

⁵ M. A. BREDIG, H. H. FRANCK et H. FULDNER, *Z. Elektrochem.* 38, 158 (1932).



la même substance de base dont le radiogramme ressemble à celui de l'apatite, additionnée d'une impureté (les radiogrammes des 6 précipités, avant et après calcination, sont rassemblés à la figure).

Les produits 1 à 3 renferment comme impureté, avant calcination, de la monétite comme l'indique la présence sur les radiogrammes des raies *a* et *b* correspondant aux distances réticulaires 3,35 et 2,95 kX. Après calcination, les radiogrammes obtenus de ces produits montrent les raies du phosphate tricalcique β auxquelles s'ajoutent celles du pyrophosphate β , 3,31, 3,03 et 2,78 kX (*e*, *d*, *c*).

Le radiogramme du produit 4 ne porte qu'une seule raie différente de celles du phosphate tricalcique β , très faible et appartenant également au pyrophosphate β (3,00 kX). Ce produit 4 réalisé avec les proportions rigoureusement stœchiométriques de phosphate trisodique et de chlorure calcique (en proportion de 3 M pour 2 M) permet de constater que la réaction tendant à former le phosphate tricalcique α n'est cependant pas absolument complète et qu'il se constitue des quantités infimes de phosphate dicalcique en même temps que le calcium correspondant se laisse adsorber par le phosphate tricalcique α . Ceci prouve qu'il est impossible d'obtenir le dernier sel absolument pur, mais que l'on peut toutefois, en se plaçant dans les conditions convenables, réaliser un précipité susceptible d'entraîner un minimum d'éléments étrangers.

Les clichés 5 et 6, obtenus avant calcination, ne montrent pas d'autres raies que celles du phosphate tricalcique α en raison de la faible intensité des lignes d'interférence de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ et de la finesse de ses particules. En revanche, après calcination à 900° C, on trouve les raies de l'oxyapatite et celles de 2,39 et

1,69 kX croissant d'intensité de 5 à 6 et appartenant au CaO (*g* et *f*).

La préparation 5 est obtenue comme le 4 en mélangeant les proportions stœchiométriques de Ca^{++} et de PO_4^{3-} , mais la qualité moléculaire du calcium n'est pas la même: il s'agit cette fois de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. En conséquence, la calcination qui transformait le phosphate α en phosphate β dans le cas précédent, le fait passer cette fois dans une molécule d'apatite parce que le précipité avait pu se charger d'une quantité de chaux stœchiométriquement suffisante.

Le fait d'utiliser la chaux comme réactif déplace donc l'équilibre final des réactions si bien que la quantité de chaux adsorbée augmente de telle sorte que le produit obtenu à la calcination n'est pas un phosphate déshydraté, mais une oxyapatite. La pureté du phosphate tricalcique α dépend donc non seulement de la quantité relative des réactifs mis en jeu, mais aussi de leur qualité chimique¹.

Les résultats d'analyse chimique viennent à l'appui de notre interprétation. Seuls les précipités 3 et 4 accusent un rapport Ca/P correspondant au phosphate tricalcique α (1,94). Les produits 1 et 2 donnent une valeur trop basse, les 5 et 6 une valeur trop élevée. Les uns sont constitués de phosphate tricalcique additionné de brushite facilement reconnaissable au microscope polarisant. Les autres répondent au sel tertiaire ayant adsorbé de la chaux en proportion d'autant plus grande que le nombre d'équivalents Ca mis en réaction est grand. Le cas des deux derniers produits se ren-

¹ Notons que certains détails portés sur nos clichés ont été estompés ou même complètement effacés par suite des traitements qu'ils ont subis pour devenir aptes à la reproduction typographique. Ces détails sont nettement visibles sur les clichés originaux.

N°	Réactifs	Avant calcination			Après calcination à 900°			
		Radiogramme	I. R.	Aspect	Rapport Ca/P	Radiogramme	I. R.	Aspect
1	$H_3PO_4 + 1,8$ éq. $Ca(OH)_2$	Apatite + monétite	1,572	2 phases: quasi-isotope + anisotope (brushite)	1,87	Phosph. β + $Ca_2P_2O_7$ β	1,618	phase pratiquement isotope + cristaux de brushite transf.
2	$H_3PO_4 + 2,2$ éq. $Ca(OH)_2$	Apatite + monétite	1,576	idem	1,87	Phosph. β + $Ca_2P_2O_7$ β	1,618	idem
3	$H_3PO_4 + 2,6$ éq. $Ca(OH)_2$	Apatite + monétite	1,570	idem	1,95	Phosph. β + $Ca_2P_2O_7$ β	1,619	idem
4	$Na_3PO_4 + 3$ éq. $CaCl_2$	Apatite	1,572	1 phase: isotr.	1,94	Phosph. β + $Ca_2P_2O_7$ (très peu)	1,619	1 phase: isotr.
5	$Na_3PO_4 + 3$ éq. $Ca(OH)_2$	Apatite	1,572	idem	2,11	Apatite + CaO	1,645	idem
6	$Na_3PO_4 + 4$ éq. $Ca(OH)_2$	Apatite	1,560	idem	2,42	Apatite + CaO	1,647	idem

contre le plus fréquemment quand on étudie des phosphates tricalciques commerciaux.

Conformément aux conclusions de FOURETIER¹, si au lieu de sécher les précipités dès leur formation, on les laisse ne fût-ce qu'en suspension aqueuse, il se produit une hydrolyse du sel tertiaire et une libération de chaux qui se laisse adsorber par le phosphate. Ainsi, le rapport Ca/P que fournit l'analyse chimique ne cesse de s'élever au cours de l'hydrolyse, atteint à un moment donné celui de l'hydroxylapatite (ou des apatites calciques en général) (2,14), puis dépasse cette valeur. Ce phénomène a été récemment rappelé par GREENWALD². Cette élévation progressive du rapport Ca/P, capable d'amener celui-ci à une valeur bien supérieure à 2,14, indique que le précipité se charge de chaux en vertu d'un mécanisme dénué de tout caractère stoechiométrique.

La préparation 7 (le radiogramme obtenu avant et après calcination se trouve à la figure) est un précipité de phosphate tertiaire que nous avons abandonné dans ses eaux-mères pendant 8 jours. A l'analyse chimique, il donne un rapport Ca/P de 2,42.

En effet, il ne faut pas se laisser induire en erreur par une double coïncidence: l'«isomorphisme» du phosphate tricalcique α avec l'apatite et le rapport Ca/P élevé par suite d'une simple adsorption de chaux.

En somme, si le phosphate tricalcique n'a pu, grâce aux conditions d'acidité du milieu dans lequel il est né, adsorber de chaux, il accuse la formule $[Ca_3(PO_4)_2]_3 \cdot H_2(OH)_2$ et il passe à la forme $3Ca_3(PO_4)_2$ en perdant $2H_2O$ au cours de la calcination (phosphate tricalcique β). Si, au contraire, il a pu se charger de chaux, il se combine à cette dernière à une température convenable, selon la réaction $[Ca_3(PO_4)_2]_3 \cdot H_2(OH)_2 + CaO = [Ca_3(PO_4)_2]_3 \cdot CaO + 2H_2O$, et continue pratiquement à diffracter les rayons X comme les apatites pour

l'excellente raison qu'un corps de ce type s'est réellement constitué.

Une réaction similaire se produit au cours de la calcination de l'os normal entre le phosphate et le carbonate, amenant cette fois la formation de carbonato-apatite, si l'on se place dans des conditions telles que le carbonate ne puisse se décomposer, sinon la calcination de l'os conduit à la synthèse d'une oxyapatite. Cette façon de voir trouve d'ailleurs un solide argument dans le fait que dans certaines conditions de nutrition minérale, on peut obtenir un os ne renfermant pas de carbonate; ainsi, comme HIRSCHMAN et ses collaborateurs¹ l'ont montré (mais mal interprété), le phosphate tricalcique passe de la forme α à la forme β comme les phosphates précipitant en milieu déficitaire en calcium.

Notons que l'étude de l'indice de réfraction est d'un très grand secours en ce qui concerne l'interprétation des radiogrammes, car cette méthode permet de discerner le phosphate tricalcique α de l'apatite proprement dite.

Le premier accuse un indice proche de 1,572, variable avec les impuretés qu'il renferme, mais dans des limites étroites; l'hydroxylapatite naturelle (1,645 à 1,651 selon MITCHELL et coll.²) et l'oxyapatite de synthèse (1,647) ont un indice nettement plus élevé.

Rappelons, en faveur de notre théorie concernant la nature chimique du constituant principal de la substance minérale de l'os que l'indice de celle-ci est proche de 1,590, valeur un peu élevée par suite du carbonate adsorbé.

D'ailleurs, nous avons déjà présenté d'autres arguments en faveur de notre conception. Par exemple, si l'on traite par un acide faible, en quantité convenable, le phosphate ayant adsorbé de la chaux, on arrive à le

¹ G. FOURETIER, C. R. Acad. Sci. Paris 205, 413 (1937).

² L. MITCHELL, G. T. FAUST, S. B. HENDRICKS et D. S. REYNOLDS, Am. Mineralogist 28, 356 (1943).

purifier, sans le mettre lui-même en solution. A la calcination, il passe alors de la forme α à la forme β . Cet essai réussit aussi bien quand il s'agit de la substance minérale de l'os. D'autre part, si l'on soumet une apatite à l'action d'un acide, il est impossible de mettre le radical chaux en solution sans détruire la molécule entière.

Ces faits ont d'ailleurs été contrôlés récemment par CARTIER¹.

Si nous avons considéré la théorie de l'hydroxylapatite comme ne répondant pas à la réalité, c'est parce qu'elle nous a paru basée sur des arguments très faibles. Nous avons signalé dans une autre publication² que le point de départ sur lequel s'est appuyé KLEMENT pour l'énoncer, est un calcul erroné des rapports stoechiométriques existant entre les anions et les cations présents dans l'os. Enfin, nous ne pouvons admettre qu'il puisse se produire dans l'os en formation une combinaison entre un phosphate et de la chaux, alors que celle-ci présente tant d'affinité pour le CO_2 dont les humeurs circulant dans tous les tissus sont abondamment chargées.

Un des arguments utilisés par BRANDENBERGER et SCHINZ pour attaquer notre théorie réside dans la comparaison du radiogramme de l'hydroxylapatite, de la staffélite et de l'os calciné. D'après ces auteurs, il y a une ressemblance nette entre le premier et le dernier, comme il y a des différences indiscutables entre le deuxième et le troisième.

Remarquons tout d'abord que la confrontation du radiogramme de la staffélite avec celui de la fluorapatite synthétique nous permet de constater que la staffélite de BRANDENBERGER³ et SCHINZ, la staffélite de Staffel, l'hydroapatite de St-Girons et la fluorapatite synthétique donnent des radiogrammes extrêmement voisins même en ce qui concerne les intensités des raies. D'autre part, contrairement à ce que l'on croyait jusqu'ici, la staffélite n'est pas constituée principalement de carbonato-apatite, mais de fluorapatite. Ajoutons qu'à l'intensité d'une raie près, le radiogramme de la staffélite est identique à celui du même minéral calciné et que le radiogramme de l'hydroapatite est identique à celui du même produit calciné, ce qui pourrait difficilement s'expliquer, si le carbonate faisait partie de la molécule d'apatite.

Signalons encore que l'examen des clichés publiés par BRANDENBERGER et SCHINZ, bien qu'indiquant une similitude très nette entre le radiogramme de l'hydroxylapatite (d'origine inconnue) et celui de l'os calciné à 800° C, montre également par un décalage des raies correspondantes que les dimensions de la

maille de l'os calciné sont différentes de celles de l'hydroxylapatite¹.

Enfin, si nous comparons le radiogramme de l'os calciné dans des conditions telles que le carbonate ne puisse se décomposer, à celui du même matériel soumis à une température élevée (900° C) en même temps qu'à un balayage suffisant pour entraîner le CO_2 du carbonate, nous enregistrons des différences indiscutables, quoique faibles. Celles-ci permettent de démontrer que la présence ou l'absence de CO_2 dans la maille provoque de légères variations du rapport c/a des paramètres. A notre sens, ce fait ne pourrait s'interpréter si la substance minérale de l'os était une hydroxylapatite.

Remarques faites par E. BRANDENBERGER à la lecture de cet article:

Nos figures de radiogrammes, d'après lesquelles les auteurs de cette note ont cru voir des différences entre l'os calciné et l'hydroxylapatite, ne se prêtent pas à des observations rigoureuses du fait qu'elles ont été recopiées au clichage. Lorsqu'on utilise dans les deux cas une caméra de 114,4 mm et les rayons Cr-K et que l'on prend le sel gemme comme norme, les radiogrammes fournis par l'os en poudre calciné à 800° et par l'hydroxylapatite synthétique, également calcinée, concordent entièrement, dans les limites d'erreurs d'expérience. Ils présentent les mêmes angles de diffraction et donc les mêmes constantes de maille.

Réponse des auteurs:

L'argumentation donnée par E. BRANDENBERGER ne nous paraît pas suffisante. Quand il signale que le cliché de l'hydroxylapatite synthétique et celui de l'os calciné sont identiques, aux erreurs d'expérience près, il serait nécessaire de fixer l'ordre de grandeur de ces erreurs.

D'autre part, la comparaison des largeurs de doublets voisins dans les deux radiogrammes en question (comparaison pour laquelle les variations de longueur lors de la reproduction sont sans aucune influence) montre bien, conformément à des remarques que nous avons présentées récemment au Colloque sur les Combinaisons à l'Etat Solide qui s'est tenu à Paris sous l'égide du C.N.R.S., que les rapports c/a sont différents pour l'hydroxylapatite synthétique et pour l'os calciné.

Summary

In answer to objections put forward by BRANDENBERGER and SCHINZ against their theory concerning the chemical nature of bone salts, the authors afford supplementary evidence about the real crystalline and chemical entity of hydrated tricalcium phosphate. According to the conditions, the precipitate contains either dicalcium phosphate or lime and this affects the nature of the product obtained by calcination.

The mineral bone substance is not a hydroxylapatite because it turns either to carbonato-apatite or oxyapatite according to carbon dioxide being kept or not in the crystal lattice. The X-ray patterns of those two apatites are undoubtedly different.

¹ Voir à ce propos les remarques de Mr. BRANDENBERGER dans la discussion qui suit cet article.

¹ P. CARTIER, Bull. Soc. Chim. Biol. 30, 65 (1948).

² M. J. DALLEMAGNE, La nature chimique de la substance minérale osseuse. Thèse d'agrégation (Gordinne, Liège 1943).

³ E. BRANDENBERGER nous communique qu'il s'agit là de la staffélite de Nassau.