

This article was downloaded by:

On: 28 January 2011

Access details: *Access Details: Free Access*

Publisher *Taylor & Francis*

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713618290>

ADSORPTION DU COLLAGENE TYPE I SUR UNE APATITE PHOSPHOCALCIQUE DEFICIENTE

Abdelghni Ouadiay^a; Abderrahim Taitai^a

^a Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux, Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofaïl, Kénitra, Maroc

Online publication date: 16 August 2010

To cite this Article Ouadiay, Abdelghni and Taitai, Abderrahim(2004) 'ADSORPTION DU COLLAGENE TYPE I SUR UNE APATITE PHOSPHOCALCIQUE DEFICIENTE', *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 179: 9, 1845 — 1855

To link to this Article: DOI: 10.1080/10426500490466607

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/10426500490466607>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

ADSORPTION DU COLLAGÈNE TYPE I SUR UNE APATITE PHOSPHOCALCIQUE DÉFICIENTE

Abdelghni Ouadiay et Abderrahim Taitai
Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux, Département
de Chimie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail,
Kénitra, Maroc

(Received December 22, 2003; accepted January 29, 2004)

L'interaction d'un phosphate de calcium déficient, de structure apatitique, avec le collagène hydrosoluble en milieu ayant les paramètres physico-chimiques équivalents à ceux du liquide physiologique montre que la fixation du collagène est un phénomène très rapide. Elle est régit par le modèle d'adsorption de Langmuir. L'étude en fonction des configurations probables de la molécule de collagène et des surfaces occupées correspondantes montre que l'adsorption du collagène se fait de façon préférentielle selon la position longitudinale.

The interaction of an apatitic, poorly crystallized calcium phosphate with water-soluble collagen in physiological NaCl solution shows that the fixation of collagen is very fast. It can be described by the Langmuir model. The adsorption of collagen occurs preferably in longitudinal position on the calcium phosphate surface.

Keywords: Adsorption of collagen; apatitic calcium phosphate; Langmuir; medium nearly physiologic

INTRODUCTION

L'interaction de biopolymères avec des substrats inorganiques, destinés aux usages biomédicaux, attire encore l'intention de nombreux chercheurs.^{1–4} L'os, en effet, est composé d'une fraction minérale phosphocalcique qui possède une structure apatitique et d'une fraction organique. Pour la dentine cette fraction organique est constituée de collagène type I avec des traces de collagène type V. Pour l'os et le ciment outre la présence dominante du collagène type I on trouve des traces

Address correspondence to Abderrahim Taitai, Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux, Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, 14000, Kénitra, Maroc. E-mail: ataitai@yahoo.fr

de collagène type II.⁵⁻⁷ Notons qu'à cette fraction organique on a une phosphoprotéine mise récemment en évidence dont le rôle reste très important dans les mécanismes d'ossification.⁸⁻⁹

Dans le présent travail, on s'est intéressé à l'étude de la fixation du collagène sur un biomatériau phosphocalcique en milieu dit physiologique.¹⁰ Ce travail rentre d'une part dans le cadre de l'intérêt que revêt l'étude des phénomènes d'adsorption dans la protection de l'émail dentaire et d'autres part dans les possibilités de comblement des pertes osseuses et des traitements d'ostéochondrites.¹¹

Le phosphate de calcium utilisé est de structure apatitique. C'est un modèle simple qui présente beaucoup d'analogies avec la fraction minérale du tissu calcifié nouvellement formée. Cette dernière a été décrite comme étant une apatite phosphocalcique déficiente, que son état de cristallisation s'améliore et son rapport atomique Ca/P augmente avec l'âge de l'individu.¹² C'est bien le cas du phosphate de calcium qu'on se propose d'étudier où le rapport Ca/P initialement égal à 1,33 peut atteindre dans certaines conditions des valeurs de l'ordre de 1,60.¹³

MATERIAUX ET METHODES

Matériaux

Le collagène utilisé est une variété hydrosoluble de masse molaire $M = 20000$ g/mol (C.a). Les études font apparaître plus de 21 types de collagène différents^{14,15} (Tableau I). Toute fois, ces biopolymères possèdent communément trois chaînes polypeptidiques d'environ 1000 acides aminés. Chacune des ces trois chaînes forme une hélice, ce qui confère au biopolymère une forme de super hélice avec une longueur (\mathcal{L}) et un diamètre (d) respectivement de 300 nm et 1,5 nm.⁶

Le biomatériau phosphocalcique préconisé est un phosphate de calcium déficient de structure apatitique de rapport atomique Ca/P = $1,33 \pm 0,02$. Il est obtenu à 37°C en milieu eau-éthanol (50% d'éthanol

TABLEAU I Différents Types de Collagène

Type I	Os et peaux
Type II	Cartilages, cristallin de l'œil
Type III	Vaisseaux sanguins
Type IV	Membranes basales de tous les organes
Type V	Tendons, cornée, tissus interstitiels
Type VI...	Foie, rein...

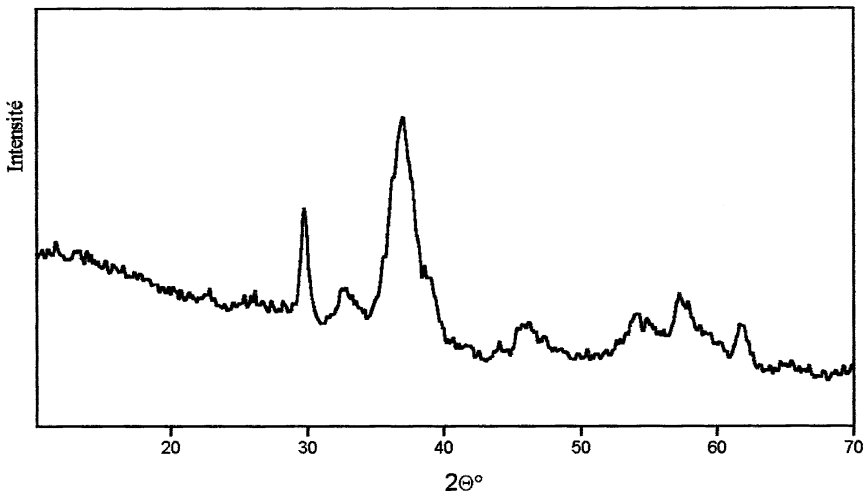


FIGURE 1 Diagramme de diffraction des rayons X de l'OCPa fraîchement préparé ($\lambda = 1,78892$ nm).

en volume) de constante diélectrique inférieure à celle de l'eau selon la méthode décrite par Zahidi et coll.^{17,18} Cette méthode consiste en une coprécipitation rapide entre une solution A de sel de calcium et une solution ammoniacale B d'ions orthophosphate. De façon plus précise, la solution A est constituée de 30 millimoles de nitrate de calcium, 100 ml d'eau et 100 ml d'éthanol. La solution B est constituée de 30 millimoles de phosphate biammoniacal, de 250 ml d'eau, 45 ml d'une solution d'ammoniaque et de 295 ml d'éthanol. Le coprécipité obtenu est séché à l'étuve pendant 24 heures.

L'analyse par diffraction des rayons X (Figure 1) et spectroscopie d'absorption IR (Figure 2) montre que le solide séché est de structure apatitique. L'analyse chimique donne un rapport Ca/P de 1.33 ± 0.02 . Ce phosphate est appelé phosphate octocalcique apatitique de formule



Il est noté OCPa, par analogie avec le phosphate octocalcique triclinique OCPtr.

Mode Opératoire

Tous les essais ont été réalisés dans un bain thermostaté à 37°C. A toutes les solutions de collagène nous avons ajouté du CHCl_3 à 0.05% afin de limiter l'éventualité d'une activité bactérienne (6). La force

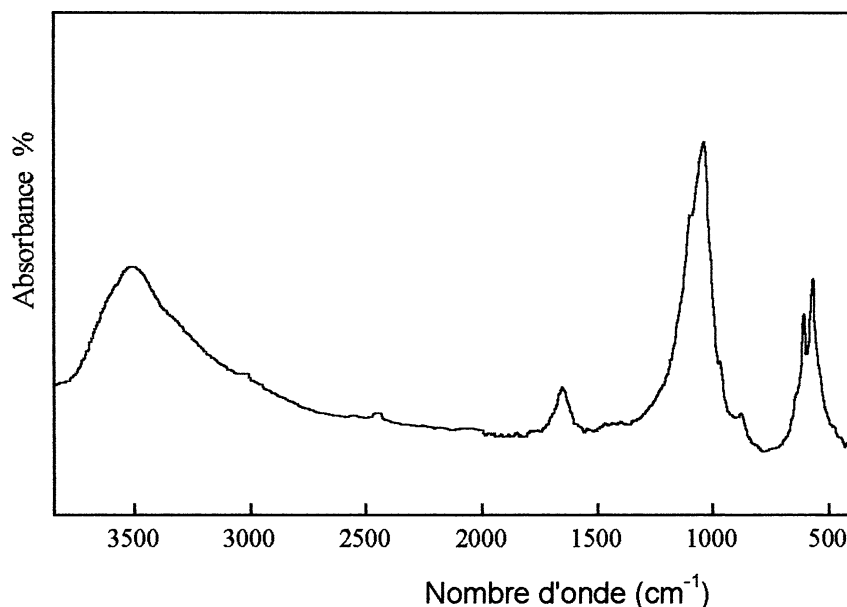


FIGURE 2 Spectre d'absorption infra rouge de l'OCPa fraîchement préparé.

ionique est fixée à 0.16 debye en utilisant l'électrolyte NaCl. Les teneurs en collagène sont comprises entre 10 et 100 ppm.

Dans des tubes à essai, contenant initialement 10 ml de la solution de collagène, sont rajoutés 100 mg d'OCPa fraîchement préparé et finement broyé. Le mélange est agité pendant une minute à une vitesse de 1000 tours/mn. Le mélange est porté ensuite dans un bain thermostaté à $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Après traitement, le solide est séparé par filtration sur verre fritté. La teneur de la solution en collagène a été déterminée par spectrophotométrie UV à 280 nm. Les concentrations en ion calcium ont été déterminées par complexométrie en retour, l'agent complexant étant l'E.D.T.A.,¹⁹ celles en ion orthophosphate selon la méthode qui met en œuvre la formation en milieu acide du complexe jaune phosphovanado-molybdique dont le maximum d'absorption se situe vers 460 nm.²⁰

La quantité de collagène adsorbée (Q_{ads}) est donnée par:

$$Q_{\text{ads}} = v \cdot (C_o - C_{\text{eq}})/m$$

avec Q_{ads} : Quantité adsorbée par unité de masse ($\mu\text{mol/g}$), C_o : Concentration initiale de la solution en collagène ($\mu\text{mol/l}$), C_{eq} : Concentration à l'équilibre de la solution en collagène ($\mu\text{mol/l}$), m : masse du phosphate de calcium (g), et v : volume de la solution (litre).

TABLEAU II Variation de la Teneur de la Solution en Collagène C (ppm) en Fonction du Temps t (mn)

C (ppm)	0	5	10	15	20	40	60	100	180	240
t (mn)	0.70	0.525	0.489	0.414	0.416	0.415	0.417	0.416	0.415	0.416

RESULTATS

L'étude cinétique conduite dans des solutions de $0.7 \mu\text{mol/l}$ de collagène montre que l'équilibre d'adsorption s'établit très rapidement (Tableau II). Il est atteint à partir d'un quart d'heure de contact seulement (Figure 3). On remarque que l'essentiel de la réaction d'adsorption est observé après cinq minutes de contact. Cependant pour l'étude de l'isotherme d'adsorption, nous avons opté pour une durée de quatre heures, durée largement suffisante pour atteindre l'équilibre. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau III.

L'évolution de la quantité adsorbée a été reportée en fonction de sa concentration à l'équilibre dans le milieu (Figures 4 et 5). L'isotherme obtenu est de type Langmuir.²¹ Les paramètres caractéristiques de l'adsorption, à savoir Q_∞ et la constante b (l/mol) sont déterminés à

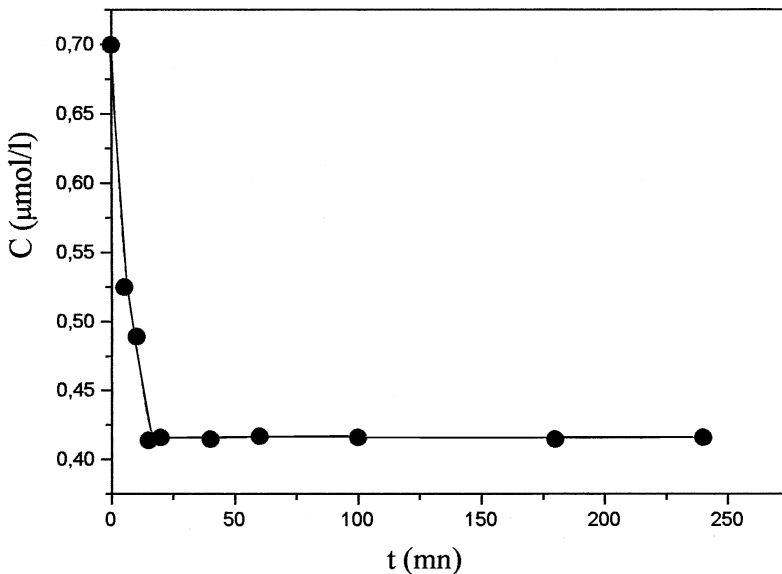
**FIGURE 3** Evolution de la concentration de collagène ($\mu\text{mol/l}$) en solution en fonction du temps t (mn).

TABLEAU III Composition et Rapport Atomique Ca/P de la Solution et du Solide à l'Équilibre pour Différentes Teneurs en Collagène

Collagène en (ppm)		pH	Ca II (mM)	PO ₄ (mM)	Ca/P solution	Ca/P solide
Initiale: C ₀	à l'équilibre: C _{eq}					
0.0	0	5.60	2.05	0.28	0.28	1.41
10.0	5.87	5.58	2.10	0.28	0.28	1.40
14.0	8.28	5.67	2.07	0.28	0.28	1.37
20.0	11.70	5.62	2.13	0.29	0.29	1.38
52	30.90	5.55	2.01	0.27	0.27	1.39
80.0	48.87	5.58	2.15	0.29	0.29	1.36
100.0	67.91	5.62	2.00	0.27	0.27	1.35

partir de l'équation de Langmuir linéarisée.¹⁴

$$1/Q_{ads} = 1/Q_{\alpha} + 1/(bQ_{\alpha}C_{eq})$$

où: Q_{ads} est la quantité adsorbée ($\mu\text{mol/g}$) pour une concentration donnée en collagène, Q_{α} est la teneur maximale d'adsorption ($\mu\text{mol/g}$), C_{eq} est la concentration du collagène à l'équilibre ($\mu\text{mol/l}$). La constante 'b' désigne selon le même modèle, le terme énergétique de l'équation. Les valeurs de ces constantes sont regroupées dans le Tableau IV, où σ représente dans l'hypothèse d'un recouvrement total, la surface ou la fraction de surface occupée par la molécule adsorbée, elle est donnée

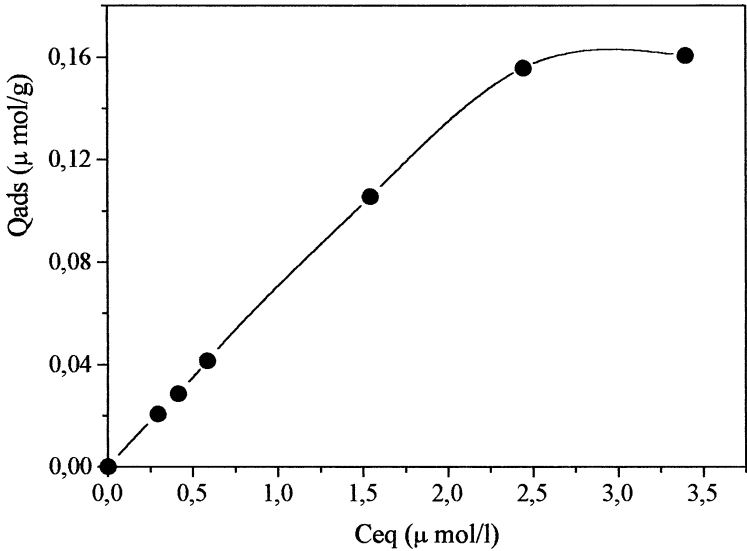


FIGURE 4 Evolution de Q_{ads} ($\mu\text{mol/g}$) en fonction de C_{eq} ($\mu\text{mol/l}$) de collagène.

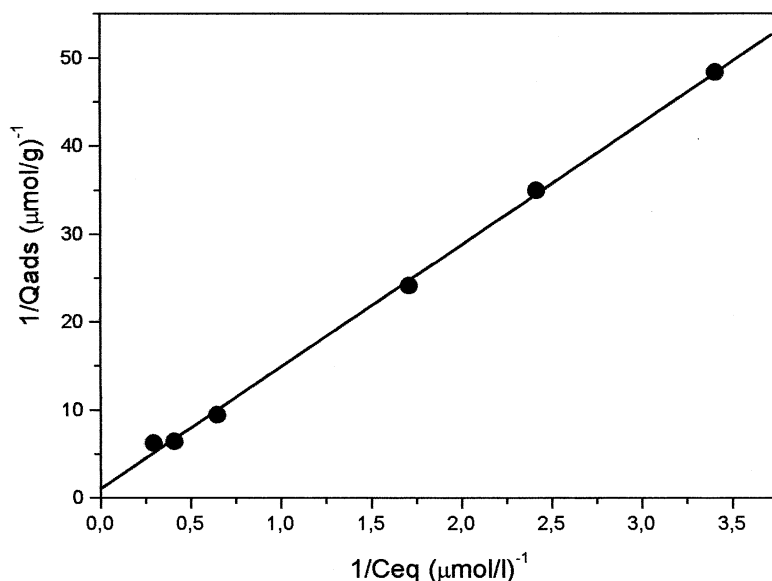


FIGURE 5 Evolution de $1/Q_{ads} (\mu\text{mol/g})^{-1}$ en fonction de $1/C_{eq} (\mu\text{mol/l})^{-1}$.

par:

$$\sigma = S/(N \cdot Q_{\alpha})$$

avec S = surface spécifique de l'adsorbant ($73.5 \text{ m}^2/\text{g}$), N = nombre d'Avogadro, et Q_{α} = la quantité adsorbée à la saturation.

DISCUSSION

La fixation du collagène sur le support phosphocalcique suit le modèle de Langmuir. Dans le cadre des hypothèses de ce modèle, l'interaction entre l'adsorbât et l'adsorbant ait lieu de sorte que:

- l'énergie d'interaction entre l'adsorbât et l'adsorbant reste constante.
- L'entité adsorbée ne réagit pas avec celle de même nature qui se trouve à l'interface solide-solution.


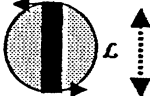
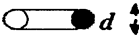
TABLEAU IV Constantes Relatives à l'adsorption du Collagène

Pente à la droite	Ordonnée à l'origine	Q_{α} ($\mu\text{mole/g}$)	Constante b ($1/\mu\text{mol}$)	Surface σ (nm^2)
13.86	1.08	0.93	0.07799	132

La première hypothèse peut s'expliquer par le fait que l'adsorption de collagène à la surface du support phosphaté est due principalement à l'établissement de liaisons hydrogène entre la surface du phosphate de calcium et les groupements formant les liaisons peptidiques de la protéine, ainsi qu'à la présence de forces électrostatiques (coulombiennes) entre les fonctions organiques des chaînes protéiques et la surface apatitique chargée positivement aux pH enregistrés dans tous les essais.¹

Le taux maximal d'adsorption, montre que la surface du phosphate de calcium réservée pour qu'une molécule s'y adsorbe est $\sigma = 132 \text{ nm}^2$. Compte tenu du travail réalisé par Misra¹⁵ qui trouve une valeur de $\sigma = 0.52 \text{ nm}^2$ pour les ions citrate sur une surface apatitique, et que la surface de ces ions calculée à partir des modéculaires prend des valeurs de l'ordre de 0.5 à 0.6 nm^2 , cet auteur déduit que la surface adsorbante se répartit de sorte à ce qu'une molécule citrate occupe une surface qui lui est égale. Cette hypothèse ne peut s'appliquer dans notre cas, vu la valeur de σ trouvée, et la structure du biopolymère. Ce dernier peut présenter plusieurs configurations que nous avons regroupées dans le Tableau V. Le choix de ces configurations repose d'une part sur les postulats du modèle d'adsorption de Langmuir, et d'autres parts sur le fait que les liaisons intra-chaînes formant l'hélice de la protéine sont fortes

TABLEAU V Configurations Probables du Collagène Adsorbée

Configurations probables	Surfaces occupées (nm ²)	Schémas
Latérale 1 La molécule se fixe suivant sa surface latérale.	$\mathcal{L}.d = 450 \text{ nm}^2$	
Latérale 2 La molécule se fixe en occupant une surface circulaire de diamètre égal à sa longueur \mathcal{L}	$(\mathcal{L}/2. \mathcal{L}/2) \pi . = 70650 \text{ nm}^2$	
Longitudinale La molécule se fixe longitudinalement et occupe une fraction de surface circulaire de diamètre égal à sa largeur d .	$(d/2.d/2)\pi = 1.77 \text{ nm}^2$	

pour omettre la probabilité pour qu'elle puisse avoir d'autre configurations selon lesquelles la macromolécule se trouve en une configuration ovale, pliée ou autres.⁹

On constate qu'aucune des surfaces calculées ne correspond à la valeur de σ calculée. La configuration «latérale 2» selon laquelle la molécule occupe une surface circulaire de diamètre égale à sa longueur ($L = 300$ nm) est trop excessive. La probabilité pour que la fixation ait lieu selon cette configuration est donc pratiquement nulle. Il reste les deux autres configurations. Les probabilités pour que la surface adsorbante soit recouverte par l'une ou l'autre des deux configurations peuvent être calculées:

$$\begin{cases} X \cdot S_x + Y \cdot S_y = \sigma \\ X + Y = 1 \end{cases}$$

avec X: Probabilité d'adsorption selon la configuration «longitudinale» de surface $S_x = 1.77$ nm², et Y: Probabilité d'adsorption selon la configuration «latérale 1» de surface $S_y = 450$ nm².

Soit $X = 0,71$ et $Y = 0,29$. Ce qui montre que le collagène se fixe à la surface du phosphate de calcium de préférence selon le mode longitudinal: pour 7 molécules adsorbées longitudinalement, il y a 3 qui sont adsorbées selon le mode latérale 1.

Par ailleurs comme il a été déjà rapporté dans le cas de l'étude de l'adsorption de la glycine,²⁸ l'examen de l'évolution du rapport Ca/P du solide après adsorption montre que l'adsorption du collagène réduit ou l'évolution du phosphate de calcium en solution. On observe pour 100 ppm de collagène un rapport atomique Ca/P du solide de 1,35 alors qu'en absence du collagène et dans les mêmes conditions ce rapport est de 1,41, ce qui peut également expliquer la plus grande libération observée d'ion phosphate par rapport aux ions calcium en solution.

En effet l'analyse de la solution donne des valeurs de pH légèrement acide. Les rapports atomiques Ca/P sont dans tous les cas inférieurs à celui du solide de départ ($Ca/P = 1,33$), ce qui montre une dissolution non congruente de l'OCPa: le solide phosphocalcique libère plus d'ions phosphate que d'ions calcium. Ce phénomène généralement appelé évolution ou maturation²⁴ engendre l'obtention d'un phosphate de calcium à caractère plus basique au dépend de la solution qui voit son pH diminuer.

La présence de collagène en solution, semble dans tous les cas ne pas affecter la teneur de la solution en ion calcium ou orthophosphate. On sait en effet que cette protéine qui existe en prédominance dans les tissu calcifiés est neutre dans les mécanismes d'ostéogénèse.⁶ Seuls

les phosphoprotéines (P.P) qui possèdent un caractère acide ont été décrites comme étant des précurseurs de la minéralisation par fixation d'ions calcium. On peut donc suggérer vu l'affinité du collagène à se fixer en milieu aqueux de force ionique équivalente à celle du liquide physiologique et à des pH légèrement acides à la surface du support phosphocalcique riche en ions HPO_4^{2-} , que la matrice collagénique est un milieu dans lequel sont dispersées les phosphoprotéines et la phase minérale apatitique de l'os nouvellement formée.

CONCLUSION

Cette étude montre qu'en milieu dit physiologique, le collagène type I hydrosoluble s'adsorbe à la surface de l'OCPa. Cette adsorption peut être décrite selon le modèle de Langmuir. Les déductions faites sur la base de la conception de ce modèle ont montré que la biopolymère s'adsorbe de façon préférentielle selon sa configuration longitudinale.

Ces résultats concordent bien avec les observations faites par Glimcher.²⁵ Ce dernier a rapporté qu'en premier lieu la précipitation in vivo de la phase minérale des tissus calcifiés commence dans les interstices qui se situent entre les queues et les têtes des macromolécules du collagène disposées en rangées parallèles les unes à côté des autres.

Ainsi ces résultats offrent la possibilité de développer des modèles pour les mécanismes de formation des os et de déterminer avec certitude la nature du mélange existant entre la fraction minérale et la partie organique des tissus calcifiés pour enfin développer des biomatériaux phosphocalciques destinés à la substitution osseuse où l'interaction avec la matrice collagénique serait équivalente à celle de l'os nouvellement formé. Parallèlement, il serait avantageux de penser à l'utilisation de phosphate de calcium apatitique déficient avec un faible rapport atomique Ca/P et contenant de faibles teneurs en ions présents en milieu physiologique tels les ions magnésium et carbonate qui sont impliqués dans le processus de la biominéralisation.²⁶

BIBLIOGRAPHIE

- [1] D. N. Misra, *Adsorption on and Surface Chemistry of Hydroxyapatite* (Plenum Press, New York, 1984).
- [2] H. Yu, T. Oho, and X. Xu, *J. Dentistry*, **23**, 101 (1995).
- [3] D. N. Misra, *J. Dent. Res.*, **76**, 1418 (1996).
- [4] S. Ouizat, A. Barroug, A. Legrouri, and C. Rey, *Materials Res. Bull.*, **34**, 14 (1999).
- [5] H. L. Esot, *Eur. J. Biochem.*, **116**, 541 (1981).

- [6] E. C. Munksgaard, M. Rhodes, R. Mayne, and W. T. Butler, *Eur. J. Biochem.*, **82**, 609 (1978).
- [7] J. Sodek and S. M. Mandell, *Biochemistry*, **21**, 2011 (1982).
- [8] V. Arthur, *J. Bone Min. Res.*, **8**, 493 (1993).
- [9] J. D. Termine and P. G. Robey, Bone matrix proteins and the mineralization process. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorder of Mineral Metabolism*, edited by M. J. Favus et al., 3rd ed. (Lippinott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1996), p. 24.
- [10] E. C. Moreno and H. C. Margolis, *J. Dent. Res.*, **67**, 1181 (1988).
- [11] T. Aoba, E. C. Moreno, and S. Shimoda, *Calcif. Tiss. Int.*, **51**, 143 (1992).
- [12] C. Rey, B. Collin, T. Goehl, M. Shimizu, and M. T. Glimcher, *Calcif. Tiss. Int.*, **46**, 384 (1990).
- [13] A. Ouadiay, Thèse, Univ. Ibn. Tofail, Faculté des sciences de Kénitra, Maroc (1997).
- [14] P. Bornsrein and W. Traub, The chemistry and biology of collagen. *The Proteins*, 3rd ed., edited by Neurath and R. L. Hill (Academic Press Inc., New York, 1979).
- [15] D. J. Prockop and K. I. Kivirikko, Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 403 (1995).
- [16] D. R. Eyre, Collagen: Molecular diversity in body's protein scaffold. *Science*, **207**, 1315 (1980).
- [17] E. Zahidi, Thèse, INP, Toulouse, France (1984).
- [18] E. Zahidi, A. Lebugle, and G. Bonel, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **4**, 523 (1985).
- [19] G. Charlot, *Chimie Analytique Quantitative II*, Sixième éd. (1974).
- [20] A. Gee and V. R. Deitz, *Anal. Chem.*, **25**, 1320 (1953).
- [21] W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces* (Interscience, New York, 1960), p. 574.
- [22] D. N. Misra, *J. Dent. Res.*, **75**, 1418 (1996).
- [23] M. Bennani-ziatni, A. Lebugle, A. Taitai, and M. Ferhat, *Ann. Chim. Fr.*, **22**, 537 (1997).
- [24] E. Eanes and J. Meyer, *J. Calcif. Tissue Res.*, **23**, 259 (1977).
- [25] M. J. Glimcher, Composition, structure, and organization of bone and other mineralized tissues and the mechanism of calcification. In *Handbook of physiology, vol. 7. Endocrinology*, edited by R. O. Greep and E. B. Astwood (American Physiological Society, Washington, DC, 1996).
- [26] T. Aoba, E. C. Moreno, and S. Shimoda, *Calcif. Tiss. Res.*, **23**, 86 (1987).