

THESE

présentée pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L' UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
mention ODONTOLOGIE

par
Charles BENGONDO MESSANGA
Docteur en Chirurgie Dentaire

SYNTHESE MODELISEE DE POLYMERES ADSORBABLES
HYDROSOLUBLES, INHIBITEURS DE LA DISSOLUTION
DES HYDROXYAPATITES ET A ACTION PROPHYLACTIQUE
CONTRE LA CARIE DENTAIRE

Soutenue le 24 février 1992 devant la commission d'examen

M.	R.M. FRANK	Président
Mme	N. FOREST	Examineurs
MM.	B. SEBILLE	
	Ph. GRAMAIN	
	J.C. VOEGEL	

Pour toi mon père, homme infatigable, pour tous les sacrifices et les privations consentis pour mes études.

Félicité, pour toutes ces années au cours desquelles tu as supporté la solitude afin que je puisse terminer cette thèse.

Pour toi, mon petit Kévin Dexter.

Père Paul et maman, pour toute votre tendresse et affection.

Chantal, pour ces nuits de veille au labo, m'évitant la solitude.

Pour tous ceux qui me sont chers.

Ce travail a été réalisé au Centre de Recherches Odontologiques et à l'Institut Charles Sadron (Centre de Recherches sur les macromolécules) de Strasbourg.

Je remercie monsieur le Professeur R.M. Frank pour m'avoir accepté au centre de recherches odontologiques ainsi que pour le grand honneur qu'il me fait en présidant le jury de cette thèse. Pour ses encouragements et son soutien au cours de ces années d'étude, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Madame le Professeur N. Forest, malgré ses lourdes responsabilités, me fait un très grand honneur en acceptant de juger ce travail et de siéger dans le jury de cette thèse en tant que rapporteur. Qu'il me soit permis de lui exprimer toute ma gratitude.

Mes remerciements vont également à monsieur le Professeur B. Sébille qui a accepté de juger ce travail.

Au moment de soutenir cette thèse, je voudrai exprimer toute ma reconnaissance au Docteur J.C. Voegel qui m'~~avait~~ gentiment accueilli dans l'équipe de biophysique dont il a la responsabilité. Nos discussions régulières, parfois de vive voix mais toujours constructives, ont à chaque moment suscité un effort de travail supplémentaire, indispensable à la réalisation d'un travail rigoureux. Je lui dis, merci pour tout.

Le Docteur Ph. Gramain m'a chaleureusement accueilli dans son laboratoire pour les synthèses de polymères. Il a toujours su redynamiser le candidat défaillant dans les moments de découragement. De nombreuses discussions de mise au point m'ont permis de mener à bien ces synthèses et d'interpréter les résultats expérimentaux. Je lui adresse mes sincères remerciements.

Rien de plus difficile que d'expliquer les techniques de polymérisation à un candidat dont la formation de base n'est pas axée sur la chimie. Mais avec patience et méthode, le Docteur Y. Frère a conduit mes pas hésitants dans les voies de la synthèse des polymères. Pour ton encadrement et ton amitié, grand merci, Yves.

La réalisation des expériences d'adhérence et de croissance des bactéries a été possible grâce aux conseils de l'équipe de microbiologie. Qu'il me soit permis de remercier les Docteurs J.P. Klein, M. Schöller et N. Schatz pour la mise au point des protocoles expérimentaux et la culture des bactéries.

Mon entrée dans l'équipe de biophysique a été heureuse car j'y ai trouvé J.M. Thomann; il m'a beaucoup aidé dans la compréhension et l'analyse des résultats expérimentaux. Il a guidé mes premiers pas dans ce laboratoire. Pour tout cela, merci, Jean-Marie.

Mlle C. Huguenard m'a aidé pour la radioactivité; je lui dis merci. De la même manière, P. Gasser, F. Gorce, S. Behr, Hélène, merci pour votre aide. Tous mes amis du CRO et du CRM, merci pour votre accueil.

Madame le professeur J. Sommermater m'a accepté dans le service de Pédodontie pendant toutes ces années. Je voudrai lui dire merci pour la confiance et le soutien qu'elle m'a accordés.

Marie-Jo, merci pour les diapositives.

Mireille, merci pour toute ton attention et ton assistance

INTRODUCTION

L'état de santé d'un individu dans une société donnée est lié à l'équilibre entre des facteurs physiologiques, économiques et socio-culturels dont le maintien est souvent assez délicat. Une dérégulation, aussi minime soit-elle peut modifier de façon radicale les paramètres de cet équilibre. Les perturbations physiologiques engendrent des pathologies de gravité variée qui, pour certaines, peuvent directement porter préjudice au pronostic de la vie. Si toutes les pathologies ne provoquent pas immédiatement des drames, il en est qui, par leurs caractéristiques algésiques, créent de sérieux maux physiologiques et relationnels; la carie dentaire fait partie de cette catégorie. Négligée, une lésion carieuse peut être à l'origine de complications multiples loco-régionales et à distance. Une liste étendue de ces complications ne trouve pas sa place dans un travail comme celui-ci, mais il est bien connu qu'une lésion carieuse est une porte d'entrée pour les bactéries vers les tissus profonds de l'organisme. L'atteinte pulpaire engendre des pulpites qui se caractérisent par des douleurs vives. L'évolution de l'infection en direction des tissus osseux se traduit par des granulomes et des kystes qui fragilisent l'os. Le passage des germes dans la circulation générale à partir d'une infection apicale est à la base des endocardites bactériennes d'origine dentaire, pour ne citer que cela. Cette brève mise au point montre combien la carie peut aboutir secondairement à des situations graves. Si cette atteinte organique est l'un des aspects marquants de la pathologie carieuse, il est également important de signaler le rôle des dents dans la mastication et dans les relations sociales. Au siècle de la médiatisation, l'image de soi prend de plus en plus d'importance malgré les fluctuations culturelles (*Jenny et coll.*, 1986). Ainsi, la perte ou le délabrement des dents sont vécus par certains comme une dévalorisation dont une conséquence est la perte de l'estime de soi (*Tedesco et coll.*, 1986). Ces complications psychologiques associées aux perturbations physiologiques font de la carie dentaire une maladie sérieuse dont la dimension réelle n'est estimable que par son étendue à l'échelle planétaire, justifiant ainsi sa place de troisième fléau mondial pour l'OMS en 1989. Avec la poussée industrielle dans les pays sous développés, son ampleur va aller croissant et l'étendue des dégâts sera illimitée si des études à visée prophylactique ne sont pas menées de façon sérieuse pour aboutir à la mise au point des inhibiteurs de dissolution.

La genèse d'une lésion carieuse résulte des interactions entre les tissus dentaires, les bactéries de la plaque, les glucides alimentaires fermentescibles et d'autres constituants salivaires, conformément au schéma de *Keyes* modifié par *Barnaud* (1982). Cette multifactorialité étiologique montre la nécessité d'une convergence multidisciplinaire pour aborder cette pathologie dans sa globalité.

Au niveau des tissus dentaires, le constituant minéral majeur est un sel phosphocalcique qui correspond à l'hydroxyapatite. C'est sa dissolution en milieu acide qui matérialise la lésion carieuse.

La flore bactérienne buccale cariogène est essentiellement constituée par trois types de germes qui sont les *Actinomyces* (20%), les *Lactobacilles* (10%) et les *Streptocoques* (50%). La principale caractéristique de ces bactéries est leur aptitude à synthétiser des polysaccharides extracellulaires de nature dextranique, insolubles et solubles. Ces dextrans jouent un rôle très important dans la formation de la plaque dentaire et par conséquent dans l'initiation du processus carieux (*Gibbons et Banghart, 1967*). C'est dans le type Streptocoque que l'on a identifié les bactéries les plus cariogènes, représentées par les *Streptocoques mutans* (*Gibbons et van Houte, 1975*). Ces bactéries vont adhérer et se multiplier activement sur les surfaces dentaires grâce aux interactions entre les glycoprotéines de la pellicule acquise et des récepteurs de la surface bactérienne. Cette phase de l'adhérence bactérienne est dite saccharose indépendante. Ce n'est que secondairement que les polysaccharides extracellulaires joueront leur rôle de matrice pour l'agrégation des autres bactéries (*Hamada et Slade, 1980*). Ces bactéries métabolisent les glucides alimentaires par la voie de la glycolyse qui aboutit à la production d'acides organiques, base de la chute du pH et par conséquent initiation de la dissolution de l'hydroxyapatite et donc, genèse d'une lésion carieuse.

Il apparaît ainsi la complexité des phénomènes impliqués dans cette pathologie dont les retombées restent pourtant redoutables. Des études poussées deviennent donc indispensables pour endiguer cette maladie. Ces études peuvent être conduites par des techniques immunologiques, bactériologiques, biochimiques, biophysiques, physico-chimiques etc.... Chaque démarche se fixe des objectifs pour le contrôle d'un certain nombre de facteurs étiologiques. Ce contrôle nécessite au préalable une bonne compréhension des mécanismes qui régissent chaque phase du développement des lésions. La maîtrise des paramètres fondamentaux caractéristiques d'une étape ou du moins ceux qui semblent les plus déterminants peut faciliter la conception et la mise au point des molécules ayant des propriétés prédéfinies, susceptibles de contrôler rigoureusement la survenue de la carie. C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés au processus de la dissolution de l'hydroxyapatite, phase minérale des tissus calcifiés de l'organisme. Cette dissolution est d'autant plus importante qu'elle est la matérialisation concrète de toute lésion carieuse. Une telle étude passe dans un premier temps par une phase expérimentale *in vitro*. C'est pour cette raison que l'étude fondamentale de la dissolution des apatite a été réalisée sur des poudres d'hydroxyapatite de synthèse dont le principal avantage est l'homogénéité structurale (*Thomann, 1989*), évitant ainsi des interférences liées à l'existence des impuretés présentes dans les apatites naturelles (*LeGeros, 1981*). Cette recherche a abouti au développement d'un modèle de dissolution qui sert de base à l'explication de nombreux aspects de la carie dentaire.

Nous aborderons ce mémoire par une analyse historique de la dissolution des hydroxyapatites. Elle passera par une revue bibliographique qui permettra de faire le point sur les principaux modèles élaborés depuis ces dernières décennies au cours desquelles on cherche à comprendre les mécanismes de dissolution des apatites et les différents procédés de son inhibition. Le modèle développé dans notre unité sera présenté afin de faire ressortir son évolution jusqu'à l'heure actuelle. Les paramètres caractéristiques dégagés de ce modèle résument les conditions nécessaires pour une inhibition maximale. Ils serviront de fil conducteur pour la synthèse des molécules potentiellement inhibitrices du processus de dissolution. Pour notre investigation, nous avons choisi de tester les propriétés inhibitrices des polymères de synthèse. La synthèse de ces polymères fera l'objet du second chapitre de cette thèse. La dissolution étant un processus complexe, pour son étude il faut disposer d'une méthodologie et d'une technologie appropriées comme nous le verrons au troisième chapitre. Ces dispositions technologiques et méthodologiques facilitent l'analyse des interférences des polymères synthétisés sur la dissolution; elles seront abordées dans le quatrième et le cinquième chapitres. Comme la genèse d'une lésion carieuse ne se limite pas qu'à la seule dissolution de l'hydroxyapatite, il nous a semblé intéressant de considérer de quelle manière il est possible d'agir sur les bactéries, sans provoquer des bouleversements dans l'écosystème buccal. Nous avons ainsi testé l'influence de certains polymères synthétisés au chapitre deux sur l'adhérence non spécifique et la croissance bactériennes. Les résultats de cette étude seront développés au sixième chapitre. En se plaçant dans une perspective prophylactique en clinique, il est d'usage de se poser des questions sur la toxicité des molécules testées dans cette étude. Sans pouvoir réaliser une analyse toxicologique immédiate, une revue bibliographique au septième chapitre montrera certaines applications industrielles et biomédicales des molécules de la même famille et apportera des réponses nécessaires.

Les principales conclusions qui se dégagent au terme de cette recherche sont les suivantes:

- 1- La dissolution des apatites est auto-inhibée par la formation à l'interface d'une membrane inorganique adhérente à perméabilité sélective, à partir des produits de dégradation de la surface.
- 2- L'inhibition de la dissolution est obtenue avec les polymères synthétisés selon les données du modèle. Cette inhibition est potentialisée par le couplage des polymères aux anions inhibiteurs(F^-) dont ils servent de vecteur, assurant une protection prolongée de l'apatite par action en deux phases et mise en réserve des anions.
- 3- Les polymères synthétisés sont bactériostatiques et réduisent la fixation bactérienne sur l'hydroxyapatite.
- 4- Ces polymères sont très faiblement toxiques et leur utilisation clinique ne sera que bénéfique dans la prophylaxie de la carie.

CHAPITRE I.

DISSOLUTION DE L'HYDROXYAPATITE

I-1.REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1.A.LES MODELES DE DISSOLUTION

I-1.B.INHIBITION DE LA DISSOLUTION DES APATITES

I-2.PRESENTATION DU MODELE DEVELOPPE DANS NOTRE LABORATOIRE

I-3.CARACTERISTIQUES D'UN INHIBITEUR IDEAL

I-1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La dissolution des hydroxyapatites est un phénomène complexe qui, expérimentalement, est régi par un grand nombre de facteurs dont l'importance relative ne paraît pas toujours bien établie. Dans le but de fournir un cadre formel aux expériences destinées à clarifier ce processus, divers modèles ont été proposés dans la littérature. Tous ces modèles visent à élucider le même phénomène, tout en cherchant à rester aussi réalistes que possible, afin d'expliquer une large gamme de résultats expérimentaux. Toutefois, la complexité du phénomène imposant d'inévitables simplifications, chacune de ces approches possède ses propres caractéristiques et a pour but d'interpréter au mieux les observations expérimentales. Malgré la diversité des démarches entreprises, le but commun à toutes les recherches autour de la dissolution des hydroxyapatites est la mise en évidence des facteurs limitants de ce processus, dont la connaissance permettrait de mettre au point des techniques plus appropriées pour la prévention et la thérapeutique des pathologies qui se manifestent par une décalcification des tissus minéralisés de l'organisme.

I-1.A. LES MODELES DE DISSOLUTION

Lorsqu'un solide tel que l'hydroxyapatite est soumis à une dissolution en milieu acide, deux phénomènes simultanés ont lieu: le transport des protons de la solution vers la surface du solide (la réaction au niveau du solide), puis celui des produits de dégradation en sens inverse. La concomitance des deux phénomènes implique que la cinétique globale de la dissolution est contrôlée par le processus le plus lent. Le cas le plus complexe se présente lorsque c'est la combinaison des deux cinétiques qui gouverne la réaction. Dans tous les cas, les données expérimentales montrent systématiquement une dissolution assez lente. Les différents modèles que nous présentons ci-dessous prennent en compte cette lenteur, de manière à pouvoir dégager un ou des facteurs qui contrôleraient significativement la dissolution.

Gray (1962), utilisant des blocs d'émail humain, a réalisé des dissolutions dans des tampons acides. En considérant la faible dépendance des cinétiques vis à vis de la température et la forte influence de l'agitation, cet auteur fut le premier à proposer un modèle quantitatif de dissolution selon lequel le processus est gouverné par la diffusion des espèces chimiques impliquées dans la réaction. Il observe que la dissolution crée des microporosités dans l'émail et favorise la précipitation des produits de dégradation sous forme d'une phase plus insoluble. Gray montre également que la dissolution est proportionnelle à la concentration totale en tampon, varie avec la concentration en calcium, sans cependant dépendre linéairement de la concentration en protons.

Reprenant les conclusions de Gray, *Higuchi et coll.* (1965), pour étudier la dissolution, utilisent une apatite non stoechiométrique, sous forme de plaquettes compressées, en présence de tampons d'acides lactique et acétique. En se basant sur la loi de Fick et le produit de solubilité de l'hydroxyapatite, ils développent un modèle physique selon lequel, un équilibre s'établit à l'interface, entre le solide et la solution. Dans ce modèle, la vitesse de dissolution est uniquement déterminée par la diffusion des espèces ioniques dissoutes dans la solution aqueuse.

Nancollas et coll. (1973, 1977) utilisent le système du disque rotatif pour analyser la dissolution de l'émail de bovin dans des solutions dont les degrés de saturation sont variables. En tenant compte de l'agitation, ils concluent que la cinétique de dissolution est contrôlée par la diffusion lorsque l'agitation et la saturation sont faibles; elle passe sous le contrôle de la réaction solide à fortes agitation et saturation. Le processus général serait donc gouverné par la diffusion des protons vers la surface et celle des phosphates issus de la réaction, en sens inverse.

Wu et coll. (1976), reprenant le modèle proposé par Higuchi, mettent en évidence un site préférentiel de dissolution qui serait actif lorsque la solution de dissolution est fortement sous-saturée.

Fawzi et coll. (1978), partant du modèle de Wu, mais dans des conditions de saturation partielle, mettent en évidence un second site préférentiel de dissolution qui serait actif indifféremment du degré d'insaturation de la solution de dissolution.

La combinaison des conclusions des équipes de Wu et Fawzi conduit à un modèle à deux sites de dissolution. Ce modèle implique des vitesses de dissolution rapides lorsque la surface du solide en solution est constituée uniquement d'hydroxyapatite, lente lorsque cette surface se recouvre d'une couche de produits peu solubles, provenant de la dissolution elle-même.

Christoffersen et coll. (1978, 1979, 1980) développent un modèle dans lequel la diffusion n'intervient absolument pas. La dissolution est, selon ces auteurs, contrôlée par la réaction du solide. La dissolution des microcristaux d'hydroxyapatite de synthèse équilibrés a permis à cette équipe d'observer des coefficients de diffusion très faibles, avec un gradient interfacial nul pour les protons. Ils proposent dès lors un modèle où la dissolution est gouvernée par un mécanisme de polynucléation à la surface de l'hydroxyapatite.

Driessens (1982), à la suite de plusieurs mises à l'équilibre des cristaux d'apatite, observe dans la solution des variations du rapport Ca/P se situant entre 0,8 et 1,5 selon le pH. Ces valeurs sont inférieures à celles qui découlent d'une dissolution stoechiométrique de l'hydroxyapatite.

Cet auteur conclut qu'il existe des phases cristallines diverses à la surface de l'apatite, formant une couche constituée notamment de brushite et de phosphate octacalcique contrôlant la dissolution. La présence d'excès de phosphates à la surface de l'apatite, en fonction du pH occasionnerait des réactions chimiques de surface qui seraient à l'origine d'une dissolution non stoechiométrique.

Margolis et coll.(1985) prennent en compte la possibilité de diffusion des protons à travers l'émail qui engendre un flux de produits de dégradation en sens inverse; ce flux conduit à une sursaturation de la solution dans la couche de surface, entraînant une précipitation superficielle. La surface de l'apatite est dans ce modèle le facteur limitant de la dissolution.

Cette revue bibliographique montre que, malgré la diversité des systèmes utilisés, les résultats expérimentaux sont approximativement les mêmes. Ils concordent pour conclure que les cinétiques de dissolution observées sont systématiquement trop lentes si on les compare à celles d'un processus uniquement contrôlé par une simple diffusion à travers la couche de liquide (couche de Nernst) adjacente à la surface du solide. Si cette couche intervient dans le contrôle de la dissolution, elle le fait en association avec un autre facteur qui reste à déterminer. Partant de là et compte tenu de la divergence des conclusions des études précédentes, *Gramain et coll.*(1987) ont reconsidéré l'ensemble du problème en analysant soigneusement les cinétiques de dissolution des hydroxyapatites. Ils proposent un modèle qui tient compte des aspects précédemment évoqués, mais abordent par la suite des points de vue jusque là négligés pourtant susceptibles d'apporter des nouvelles bases pour interpréter quantitativement les résultats expérimentaux et s'orienter vers la conception et la mise au point de molécules dont l'incidence sur l'inhibition de la dissolution serait déterminante. Ce modèle sera présenté au paragraphe I-2.

Ces études montrent combien il est délicat de développer des modèles qui doivent rendre compte d'un processus aussi complexe que la dissolution de l'hydroxyapatite. Cette complexité est encore plus apparente lorsque l'étude se fait au niveau ultrastructural. Par des études au microscope électronique à transmission, *Frank et coll.*, (1977) montrent que la destruction carieuse de l'émail prismatique se fait par trois mécanismes:

1. élargissement des gaines de l'émail
2. destruction diffuse des cristaux d'apatite des prismes de l'émail
3. anéantissement des substances interprismatiques de l'émail.

I-1.B. INHIBITION DE LA DISSOLUTION DES APATITES

La recherche des composés permettant une inhibition de la dissolution acide de l'hydroxyapatite remonte à une cinquantaine d'années. Ce type de recherche a pris une importance accrue avec l'extension des pathologies carieuses dans l'ensemble des pays.

Dean (1938) observait que dans les régions des Etats Unis où la fluorose était endémique à cause de l'abondance des fluorures dans les eaux de consommation, on rencontrait moins de caries que dans les régions équivalentes sans fluorures. Cette observation est le point de départ de nombreuses études épidémiologiques et divers travaux destinés à expliciter le mécanisme d'action des fluorures. La recherche d'une optimisation de l'effet des ions F^- et des modifications structurales des tissus dentaires a conduit à une mise sur le marché et à l'expérimentation fondamentale de divers composés. Il est intéressant d'en citer certains ne serait-ce que pour suivre l'évolution de la recherche dans ce domaine.

Dès 1942, *Bibby* suggère la possibilité de réduire la dissolution de l'émail par application topique de fluorure de sodium (NaF). Les observations au microscope électronique des coupes d'émail après traitement au NaF réalisées par *Gerould* (1945) montrent que la réaction se solde par la formation du fluorure de calcium (CaF_2) qui contrôle la dissolution, (*Arends et coll.*, 1975). CaF_2 se formerait rapidement à forte teneur en fluorures *Fischer et coll.* (1954) alors que la fluorohydroxyapatite se formerait à faible concentration.

Muhler et coll. (1947) traitent des poudres d'émail avec des solutions de fluorure stanneux (SnF_2) et observent une inhibition. Cette forme de fluorure est utilisée en raison de la formation de CaF_2 et du fluorophosphate d'étain ($Sn_3F_3PO_4$) peu soluble (*Jordan et coll.*, 1971).

Mühlemann et coll. (1957) introduisent les fluorures organiques où le fluor est associé à une molécule organique support mono ou diazotée comportant respectivement 16 et 27 carbones. L'association entre F^- et son support se fait par réaction directe entre l'acide fluorhydrique (HF) et la molécule. L'action semble ici résulter d'une meilleure pénétration de F^- dans l'apatite en raison de la réduction des tensions superficielles par effet de la partie organique.

Les premiers essais d'inhibition de la dissolution des apatites par des macromolécules débutent dès 1974 lorsque *Anbar et coll.* montrent que les polyphosphonates organiques adsorbés sur l'émail sont des agents potentiels de la prévention de la carie.

Cette action des polyphosphonates se trouvera confirmée en 1979 par *Bartels et Arends*. Les recherches sur l'inhibition par les macromolécules ont également conduit à tester la capacité des polyacrylamides à jouer un rôle dans le blocage de la dissolution. Les travaux débutés par *Belton et coll.* (1983) ont été confirmés; (*Grima*, (1985) et *Thomann*, (1989) ont observé une forte inhibition avec un copolymère statistique (polyacrylate de phosphoéthyl- méthylacrylate, le Coatex).

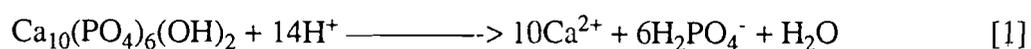
Si les recherches sur les essais d'inhibition de la dissolution des apatites demeurent importantes, il faut tout de même constater que les raisons pour lesquelles le choix se porte sur telle ou telle molécule comme agent inhibiteur ne sont pas toujours explicites. Les hypothèses pouvant justifier ces démarches n'apparaissent souvent que lorsque les tests *in vitro* ou *in vivo* ont été réalisés. Cette procédure s'apparente d'ailleurs avec la démarche de moins en moins utilisée en recherche pharmacologique et qui consiste à synthétiser des molécules et les tester au hasard sur diverses pathologies et voir si l'on peut mettre en évidence d'éventuels effets bénéfiques pour l'une ou l'autre pathologie.

Une démarche beaucoup plus originale pour une telle recherche consiste à poser des hypothèses en rapport avec les facteurs ou paramètres pouvant avoir un impact sur le phénomène étudié. L'ensemble de ces données constituera alors une base solide pour orienter particulièrement la synthèse des molécules ayant une plus grande probabilité d'avoir des incidences sur la pathologie étudiée. Une telle démarche est suivie par notre équipe dans laquelle, après avoir modélisé le processus de dissolution et défini les facteurs limitants, nous avons établi les propriétés que devraient posséder les différentes molécules et autres compositions pour être des inhibiteurs idéaux.

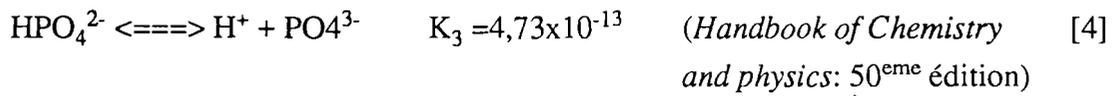
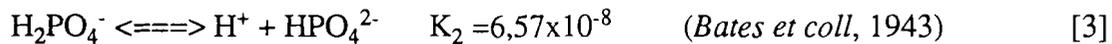
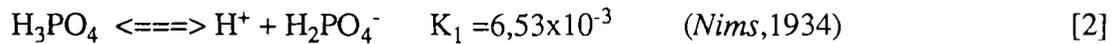
I-2. PRESENTATION DU MODELE DEVELOPPE DANS NOTRE LABORATOIRE

La cinétique de dissolution des hydroxyapatites peut être analysée en considérant les flux des espèces ioniques qui interviennent dans ce processus. Le dispositif expérimental que nous utilisons nous permet d'avoir accès aux protons consommés et au calcium libéré par l'apatite. Les phosphates qui accompagnent la libération de calcium se déduisent par calcul, à partir de la formule de l'hydroxyapatite et le pH de dissolution.

Conformément au diagramme des équilibres de *Chander et Fuerstenau* (1979) à la surface de l'hydroxyapatite en solution, la dissolution de ce solide se fait selon l'équation ci-dessous:



Pour les phosphates en solution, les équilibres suivants doivent également être pris en considération:



La prise en compte de ces relations lors de l'étude du processus de dissolution de l'apatite montre que le produit de solubilité est respecté. Ce produit de solubilité est de $1,189 \times 10^{-60}$ (Gramain et coll., 1987).

Ces équations permettent d'évaluer pour tout pH la quantité de protons nécessaire pour libérer une quantité donnée de calcium. En admettant une dissolution congruente, il faut 1,4 protons pour libérer un calcium lorsque l'on réalise une dissolution à pH 5. Cette valeur constitue le rapport de congruence théorique qui est aussi celui des flux de protons consommés ($J_{\text{H}^+}(t)$) par le calcium libéré ($J_{\text{Ca}^{2+}}(t)$) en fonction du temps. Ce rapport de congruence que nous désignons $R(t)$ est donc une caractéristique de la dissolution à un pH donné.

$$R(t) = J_{\text{H}^+}(t) / J_{\text{Ca}^{2+}}(t) \quad [5]$$

Si on considère le caractère congruent de la dissolution, alors $R(t)$ devrait être constant à tout moment. Mais expérimentalement, nous observons de manière systématique que ce rapport est supérieur à sa valeur théorique aux instants initiaux de la dissolution, valeur qui est atteinte après un temps relativement long (25 minutes). Cette observation se complète en fait avec une faible détection de calcium en solution pendant cette période. Le principe de conservation de la matière laisse entrevoir que ce calcium se trouve à la surface du solide apatitique. La valeur élevée du rapport de congruence aux instants initiaux peut donc s'expliquer par une accumulation de calcium à l'interface solide/liquide, sous forme d'une couche adhérente qui limite la vitesse de dissolution. La formation d'une telle couche est rendue possible si l'on tient compte des faibles vitesses de diffusion du calcium et des phosphates. En prenant en compte les éléments constitutifs de cette couche, un modèle dit *d'auto-inhibition* a été proposé (Gumpper, 1987; Thomann et coll., 1989). Ce modèle permet d'expliquer les faibles cinétiques de dissolution, en comparaison à un phénomène uniquement contrôlé par la diffusion à travers la couche hydrodynamique de Nernst. La nature de cette couche serait donc en première approximation le facteur principal du fort ralentissement de la diffusion des autres espèces ioniques issues de la dissolution.

Les ions intervenant dans la dissolution et auxquels nous avons accès grâce à notre technologie sont impliqués à des degrés divers dans sa limitation. Selon le modèle diffusif basé sur la première loi de Fick, le flux J_i d'un ion i à travers une couche interfaciale stationnaire est proportionnel à la différence des concentrations de cet ion entre la surface du solide et la solution. Ce flux est donné par la relation suivante:

$$J_i = SD_i(C_S - C_B) / \epsilon \quad [6]$$

avec S : surface du solide en contact avec la solution ($\text{cm}^2 \times \text{g}^{-1}$)

D_i : constante de diffusion de l'ion i ($\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$)

ϵ : épaisseur de la couche de Nernst (cm)

C_S : concentration de l'ion i à la surface du solide (moles $\times \text{cm}^{-3}$)

C_B : concentration de l'ion i dans la solution (moles $\times \text{cm}^{-3}$)

Partant de la relation [6] ci-dessus et selon le modèle diffusif, lorsque les protons sont consommés par la surface du solide, une forte vitesse de la réaction solide implique que C_S tend vers zéro et devient par conséquent très faible par rapport à C_B (Levich, 1962). Ainsi, le flux de consommation des protons devrait être proportionnel à la concentration des protons dans la solution. Ce flux est donné par la relation suivante:

$$J_{\text{H}^+} = - SD_{\text{H}^+}[\text{H}^+] / \epsilon \quad [7]$$

Cette relation montre qu'il devrait exister pour les flux de protons une relation en $[\text{H}^+]^1$. Or expérimentalement, les différentes recherches trouvent des relations en $[\text{H}^+]^{0,81}$ (Gumpper, 1987), en $[\text{H}^+]^{0,65}$ et $[\text{H}^+]^{0,75}$ (Gray, 1962), en accord avec Christoffersen (1979) qui avait trouvé une loi en $[\text{H}^+]^{0,57}$. Une telle loi permet de conclure que le gradient interfacial des protons est nul. Cette observation combinée à la grande mobilité des protons ($D_{\text{H}^+} = 9,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \times \text{s}^{-1}$, d'après Robinson et Stokes, 1959) dans l'eau montre que la diffusion des protons à travers la couche de Nernst n'est pas le facteur limitant de la dissolution dans le domaine contrôlé par la diffusion.

Un raisonnement similaire s'applique aux ions calcium provenant de la dissolution. Les concentrations en ions calcium à la surface de l'apatite et dans la solution sont en rapport avec leurs activités. Le flux de calcium à travers la couche de Nernst est donné par la relation suivante:

$$J_{\text{Ca}^{2+}} = SD_{\text{Ca}}(a_s - a) / \epsilon \quad [8]$$

avec D_{Ca} : constante de diffusion du calcium ($\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$)

a_s : activité du calcium à la surface (moles $\times \text{cm}^{-3}$)

a : activité du calcium en solution (moles $\times \text{cm}^{-3}$)

En supposant des variations négligeables de la surface de l'apatite, la relation [8] montre que toute modification des flux ioniques est liée à l'évolution du rapport $(a_s - a)/\epsilon$. La diffusion du calcium de la surface vers la solution contrôle donc le processus de dissolution de l'hydroxyapatite. Comme le calcium diffuse dans la même direction que le phosphate, mais à des vitesses différentes, la dissolution est par conséquent gouvernée par la diffusion de ces deux espèces ioniques. L'analyse des cinétiques de libération du calcium a permis à *Thomann* (1989) de définir une constante de diffusion du calcium (D_{Ca}) de l'ordre de $6,8 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{xs}^{-1}$, en partant de la relation [8]. Elle est trois ordres de grandeurs inférieure à celle déterminée dans l'eau ($1,33 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{xs}^{-1}$) (*Robinson et Stokes* (1959)). Cette diminution de la valeur apparente de la constante de diffusion a été interprétée dans le modèle par la présence d'une couche interfaciale, autre que la couche de Nernst, formée des produits de dégradation de la surface de l'apatite.

Ce modèle de la couche adhérente inhibitrice de la dissolution peut alors être traité de façon analytique.

Lorsque la vitesse d'agitation est élevée, la couche de Nernst est très réduite. Nous pouvons dès lors considérer que la diffusion des ions issus de la dissolution se fait à travers la couche adhérente formée par les produits de dégradation. L'accumulation au cours du temps de ces produits permet d'admettre que l'épaisseur δ de cette couche est une fonction du temps et peut par conséquent se noter $\delta(t)$. La vitesse instantanée de libération du calcium (dCa/dt) avec diffusion à travers la couche adhérente $\delta(t)$ peut se traduire par la relation suivante:

$$\frac{dCa}{dt} = \frac{SD_{Ca} (a_s - a(t))}{\delta(t)} \quad [9]$$

avec D_{Ca} : constante de diffusion du calcium à travers la couche $\delta(t)$

a_s : activité du calcium à saturation (surface de l'apatite)

$a(t)$: activité du calcium dans la solution à l'instant t .

Cette vitesse instantanée peut également être mise en rapport avec la diminution du volume des particules d'hydroxyapatite. Nous pouvons donc écrire la relation suivante:

$$\frac{dCa}{dt} = - \frac{5c}{V} \frac{dV}{dt} \quad [10]$$

avec c : Concentration en apatite par unité de volume. c est égale à

$6,31 \times 10^{-3} \text{ moles} \times \text{cm}^{-3}$ en admettant que la masse volumique

de l'hydroxyapatite de synthèse est de $3,17 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$

(*Davidson et coll.*, 1975).

V : volume moyen d'une particule d'apatite.

Puisque, à l'exception des instants initiaux la dissolution est congruente et non contrôlée par la diffusion des protons, la vitesse de consommation des protons s'écrit:

$$\frac{dH}{dt} = \frac{n}{5} \frac{dCa}{dt} \quad [11]$$

n étant le nombre de moles de protons nécessaires à la dissolution d'une mole d'hydroxyapatite.

La combinaison des relations [9] et [10] permet de déterminer la variation du volume particulière par rapport à la surface. Cette variation est donnée par l'équation ci-dessous:

$$-\frac{1}{S} \frac{dV}{dt} = \frac{D_{Ca}}{5c} \frac{(a_s - a(t))}{\delta(t)} dt \quad [12]$$

Les observations au microscope électronique à balayage (voir chap. III) ont montré une forme plaquettaire des particules d'apatite.

Soit S' la surface de la grande base de la plaquette; la relation [12] peut s'écrire:

$$\frac{-S' dl}{S} = \frac{D_{Ca}}{5c} \frac{(a_s - a(t))}{\delta(t)} dt \quad [13]$$

Par rapport à la surface totale S et compte tenu des faibles dimensions des différentes faces latérales de la plaquette, nous pouvons considérer que S est assimilable à $2S'$ (Thomann, 1989). Dans ce cas la relation [13] devient:

$$-dl = \frac{2 D_{Ca}}{5c} \frac{(a_s - a(t))}{\delta(t)} dt \quad [14]$$

La méconnaissance de la cinétique de formation et de la composition exacte de la couche adhérente interfaciale ne permet qu'une estimation par approximation de son épaisseur, en se basant sur une relation semi empirique tirée de l'étude de la cinétique de dissolution de l'hydroxyapatite naturelle (Gumpper, 1987). Selon cet auteur, l'épaisseur $\delta(t)$ de la couche adhérente, en fonction du temps peut être décrite par la relation suivante:

$$\delta(t) = \frac{t^{1/2}}{\alpha^{1/2} + t^{1/2}} \times \delta_{\infty} \quad [15]$$

avec α : temps caractéristique de formation de la couche (± 1 seconde (Thomann, 1989)

δ_{∞} : épaisseur maximale de la couche.

t : temps de dissolution

La combinaison de [14] et [15] conduit à la relation suivante:

$$-dl = \frac{2 D_{Ca}}{5c\delta_{\infty}} (a_s - a(t)) \frac{(\alpha^{1/2} + t^{1/2}) dt}{t^{1/2}} \quad [16]$$

dont la forme intégrale s'écrit:

$$- \int_L^l dl = \frac{2 D_{Ca}}{5c\delta_{\infty}} (a_s - a(t)) \int_0^t \frac{(\alpha^{1/2} + t^{1/2}) dt}{t^{1/2}} \quad [17]$$

Après intégration nous obtenons en définitive

$$L - l = \frac{2 D_{Ca}}{5c\delta_{\infty}} (a_s - a(t)) (t + 2\alpha^{1/2}t^{1/2}) \quad [18]$$

L et l étant respectivement la longueur et la largeur de la plaquette d'hydroxyapatite.

La relation [18] reste pratique tant que le taux de dissolution est inférieur ou égal à 30%. Au delà de cette valeur, les variations de $(a_s - a(t))$ deviennent aléatoires et compliquent l'exploitation.

Un processus comme la dissolution de l'hydroxyapatite signifie entre autre une consommation des protons par la surface du solide au cours du temps. Il est par conséquent important de définir le degré d'avancement d'un tel processus. Si X désigne ce degré, alors

$$X = \frac{QH(t)}{Q_{\infty}} \quad [19]$$

où QH(t) = quantité de protons consommés au temps t (moles/g)

Q_∞ = quantité de protons consommés après une dissolution totale.

En considérant les dimensions L et l de la plaquette, ce degré d'avancement peut aussi s'écrire:

$$X = 1 - \frac{l}{L} \quad [20]$$

La substitution de la relation [20] dans [18] permet d'aboutir à la relation quantitative décrivant le modèle mathématique jusque là considérée comme décrivant fidèlement les cinétiques de dissolution

des apatites en milieu acide:

$$X = \frac{2 D_{Ca} (a_s - a(t)) (t + 2\alpha^{1/2} t^{1/2})}{5 c \delta_{\infty} L} \quad [21]$$

Cette relation montre parfaitement que l'on peut contrôler la conversion (dissolution) de l'hydroxyapatite en modifiant:

- a) la constante de diffusion des ions à travers la couche adhérente
- b) le temps caractéristique α de formation de la couche
- c) l'épaisseur δ_{∞} de la couche.

Si cette analyse reste correcte dans l'ensemble, elle présente cependant une importante restriction dans la mesure où il n'a été pris en considération que la possibilité de formation des complexes phosphocalciques à l'interface. Or la dissolution met en jeu un ensemble d'ions qui, malgré l'importance de la complexation interfaciale, restent pour une partie porteurs de charges qui peuvent également influencer les cinétiques de dissolution.

Les premiers stades de la dissolution de l'hydroxyapatite préalablement équilibrée peuvent être décrits en terme d'échanges ioniques entre la surface du solide et la solution environnante. Ces échanges sont complexes dans la mesure où les ions issus de la dissolution, en particulier le calcium et les phosphates ont des vitesses de diffusion différentes. Leurs migrations aux instants initiaux de la dissolution se font uniquement à travers la couche de Nernst. Ce mouvement diffusif des ions à travers une telle couche est décrit par la première loi de Fick (voir relation [6]).

Cette relation reste cependant limitée au cas où l'on ne considère qu'un ion, tel n'est pas le cas ici. Les différences de vitesses de migration des différents ions à travers la couche de Nernst favorisent une réactivité qui aboutit à la formation des complexes phosphocalciques à l'interface, sans cependant annuler totalement les flux ioniques.

La diffusion difficile à travers la couche adhérente formée et à travers la couche de Nernst favorise l'adsorption des ions au sein même de cette couche adhérente, faisant d'elle une structure chargée. Des études réalisées à différents pH (*Thomann et coll.*, 1991) ont montré que la perméabilité de cette couche chargée est dépendante de la valence des anions. Cette dépendance a permis de faire l'hypothèse selon laquelle les ions adsorbés étaient des cations. Dans le cas de la dissolution de l'hydroxyapatite, ces cations ne peuvent être que des ions calcium. Cette charge positive contribue à la modulation des flux ioniques dans la mesure où, par répulsion électrique en raison de l'identité des charges, les ions calcium auront du mal à traverser la couche adhérente, alors que les anions y passeront relativement facilement, sauf s'ils se complexent avec certains ions Ca^{2+} .

L'accumulation des charges positives au sein de la couche adhérente crée une mosaïque structurale et induit des exclusions; il apparaît ainsi l'exclusion de *Donnan* et la répulsion électrique, retarderont la libération des ions provenant de la dissolution. Les anions traversant plus facilement la couche adhérente chargée, celle-ci est assimilable à une *membrane inorganique échangeuse d'anions et à perméabilité sélective*. La présence des charges dans la membrane crée un potentiel électrique.

La prise en compte de l'adsorption des charges à l'interface constitue une approche nouvelle, jusque là négligée, pour expliquer les faibles cinétiques de dissolution. La lente diffusion interfaciale du calcium, par la présence des charges dans la couche, limite la dissolution (*Thomann et coll.,1991*). La perméabilité d'un cation à travers un tel échangeur dépend prioritairement de sa valence; plus cette valence est faible plus l'effet de barrière de la membrane sera moindre (*Helfferich, 1962*). Du fait qu'elle soit chargée, le flux total d'une espèce ionique *i* à travers une telle membrane résulte du couplage entre le flux dû au gradient de concentration conformément à la première loi de Fick, (voir [6]) et à la transférence électrique liée au gradient de potentiel. Cette transférence est donnée par la relation suivante:

$$J_{ei} = - \mu_i z_i C_i \text{grad} \phi \quad [22]$$

avec μ_i : mobilité électrochimique de l'ion *i*

z_i : valence de l'ion *i*

C_i : concentration de l'ion *i*

ϕ : potentiel électrique à travers la membrane.

La mobilité μ_i d'un ion *i* est donnée par l'équation de Nernst-Einstein ci après:

$$\mu_i = \frac{D_i F}{RT} \quad [23]$$

avec D_i : coefficient de diffusion de l'ion *i* ($\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$)

F: constante de Faraday

R: constante des gaz parfaits

T: température absolue

Les valeurs mesurables par le dispositif expérimental étant des activités ioniques, nous ne considérons que le cas d'une exclusion de *Donnan* forte, de manière à pouvoir négliger dans les calculs les gradients des facteurs d'activité de l'ion *i*. Le flux de *i* à travers la membrane chargée résulte de la combinaison des relations [6], [22] et [23] correspondant à l'équation de *Nernst-Planck* qui dans sa forme

simplifiée est la suivante:

$$J_i = -SD_i \left(\frac{d[i]}{dx} + \frac{z_i[i]F}{RT} \frac{dE}{dx} \right) \quad [24]$$

avec S = surface de la membrane

D_i = coefficient de diffusion de l'ion i

[i] = concentration intramembranaire de l'ion i

z_i = valence de l'ion i

F = constante de Faraday

R = constante des gaz parfaits

T = température absolue

E = potentiel électrique membranaire

x = épaisseur membranaire.

Cette équation peut s'appliquer à toutes les espèces ioniques impliquées dans la réaction de dissolution de l'hydroxyapatite.

La membrane à perméabilité sélective et échangeuse d'anions est une barrière difficile à traverser pour les produits de dégradation tant par la présence des complexes phosphocalciques que par les charges positives générées par le calcium adsorbé. Un ion Ca^{2+} extrait du solide aura dans un premier temps à traverser la membrane chargée, puis dans un second temps la couche diffuse de Nernst d'épaisseur ϵ , adjacente à la membrane chargée. Dans une première approche assez simple, nous avons analysé ce problème de diffusion dans les deux couches adjacentes.

A l'interface apatite/membrane, l'activité est caractérisée par une valeur nommée a_s qui au niveau de l'interface membrane/couche de Nernst est a_0 . En solution, elle est désignée a. Les flux de calcium à travers la membrane chargée d'une part et la couche de Nernst d'autre part sont donnés par les relations suivantes:

$$J_{Ca^{2+}} = SD_{Ca} (a_s - a_0) / x \quad [25]$$

$$J'_{Ca^{2+}} = SD'_{Ca} (a_0 - a) / \epsilon \quad [26]$$

Les rapports SD_{Ca}/x et SD'_{Ca}/ϵ correspondent à la perméabilité du calcium (ou coefficient de transport de matière) à travers les couches. Nous désignerons ces perméabilités par P_{Ca} et P'_{Ca} respectivement. En admettant une dissolution congruente, nous pouvons

écrire la relation suivante:

$$-J_{H^+} = RJ_{Ca^{2+}} \quad [27]$$

A l'équilibre, les flux de calcium à travers les deux couches adjacentes sont égaux. En substituant le rapport SD_{Ca}/ϵ par sa valeur dans le relation [25], nous obtenons:

$$J_{Ca^{2+}} = \frac{SD_{Ca}}{x} (a_s - a_0) = P_{Ca} (a_s - a_0) \quad [28]$$

L'égalité des flux à travers les deux couches peut donc s'écrire:

$$P_{Ca} (a_s - a_0) = P_{Ca}^o (a_0 - a) \quad [29]$$

La combinaison des relations [27] [28] et [29] permet de trouver le flux total de protons qui est alors donné par la relation ci-dessous:

$$-J_{H^+} = \frac{1}{1 + K} RP_{Ca}^o (a_s - a) \quad [30]$$

où $K = P_{Ca}^o/P_{Ca}$, traduisant la diminution de la perméabilité de la membrane chargée par rapport à la couche de diffusion. La formulation du flux de protons montre que le terme $1/(1+K)$ est le facteur de réduction des vitesses de dissolution. Plus K est grand, plus la cinétique est lente, signifiant que l'inhibition de la dissolution sera d'autant plus grande (*Thomann et coll*, non encore publié). K est dans ces conditions une bonne valeur pour l'évaluation de l'inhibition de la dissolution tant par la membrane interfaciale formée par les produits de dégradation que par les agents inhibiteurs exogènes.

Etant donné que K est grand lorsque la cinétique est lente, on admet que $1+K \approx K$. La transformation de la relation [30] permet alors d'écrire l'équation suivante:

$$K = - \frac{J_{H^+}}{RP_{Ca}^o (a_s - a)} \quad [31]$$

K est en fait une relation entre les charges anioniques et cationiques de la membrane dont les variations influencent la perméabilité. La détermination de K dans sa considération fondamentale se fait à l'équilibre et pour une dissolution congruente. On suppose dans ce cas que l'adsorption des cations est un processus rapide, indépendant du temps, se développant selon une adsorption de type Langmuir. Si on désigne par b la constante d'affinité entre les cations et la surface, X_{∞} la concentration maximum de charges fixes dans la membrane; z_p la charge moyenne des phosphates présents au pH considéré, nous pouvons écrire:

dans la membrane; z_p la charge moyenne des phosphates présents au pH considéré, nous pouvons écrire:

$$K = \frac{X_{\infty} b^m P_{Ca}^{\circ}}{(1+n) P_{Ca}} \quad [32]$$

avec $n = 2/-z_p$; $m = n/(n+1)$; 2 = valence du calcium

La relation [32] permet de faire les hypothèses suivantes:

- le calcium s'adsorbe, non pas suivant une isotherme de Langmuir mais suivant une isotherme de Freundlich;
- la cinétique d'adsorption est très rapide.

Le modèle de dissolution de l'hydroxyapatite (Fig.I-1) servant de base d'interprétation de nos résultats se caractérise donc par la formation d'une couche chargée positivement par adsorption du calcium, possédant les propriétés d'une membrane inorganique à perméabilité sélective. L'effet de charges peut s'interpréter par la réduction de la surface active. Dans ce dernier cas, il est possible que les sites privilégiés pour l'attaque acide soient les régions non recouvertes de charges. Les charges ne se chevauchent pas et leur augmentation inhibe la dissolution. Cette dernière approche constitue le modèle des sphères dures récemment développé par *Gramain, Ries et coll.*, (sous presse).

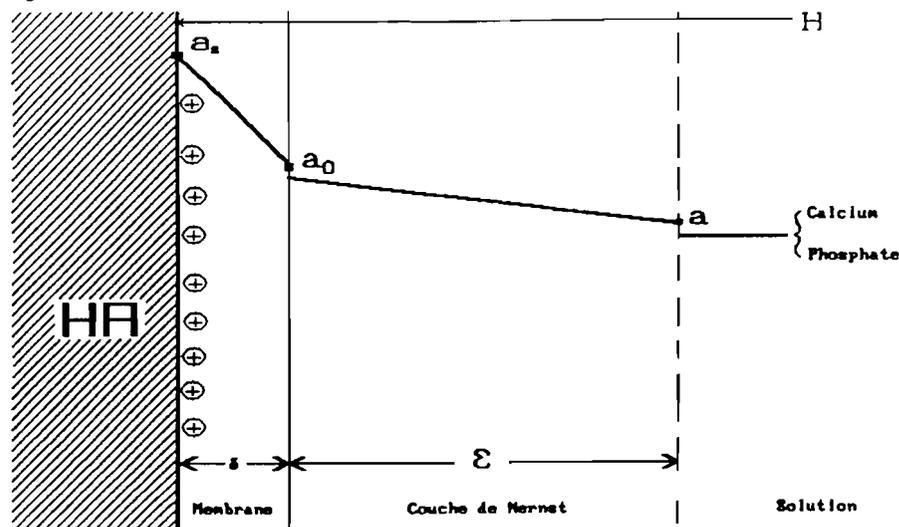


Figure I-1: Modèle de dissolution de l'hydroxyapatite. a_s , a_0 et a représentent respectivement les activités du calcium: à saturation au niveau de l'interface membrane-apatite; dans la couche de Nernst et en solution. \oplus = calcium adsorbé. δ = épaisseur de la membrane chargée; ϵ = épaisseur de la couche de Nernst.

I-3. CARACTERISTIQUES D'UN INHIBITEUR IDEAL DE DISSOLUTION

Le modèle de dissolution présenté précédemment nous permet de dégager les facteurs susceptibles de jouer un rôle de première importance dans la modulation du processus de dissolution des hydroxyapatites. Partant de ce modèle et de toute l'argumentation qui en découle, un inhibiteur idéal de la dissolution serait celui qui pourrait simultanément:

- augmenter l'épaisseur de la membrane adhérente
- augmenter les charges positives intramembranaires
- s'adsorber fortement à la surface de l'apatite
- favoriser la formation des complexes peu solubles à l'interface
- retarder la diffusion des produits de dégradation
- pouvoir s'associer aux éléments chimiques connus pour leurs propriétés inhibitrices de la dissolution.

La carie dentaire étant une pathologie plurifactorielle, l'inhibition sera d'autant plus active qu'il y aura des interactions avec certains autres facteurs étiologiques. Dans cette démarche, l'inhibition de l'adhérence bactérienne est une caractéristique supplémentaire de grande importance. De même une modulation de l'acidogenèse soit par blocage métabolique ou par régulation des variations de pH augmenterait substantiellement l'intérêt d'un tel inhibiteur pour la prévention de la carie.

Ces caractéristiques étant déterminées, quelle démarche peut-on considérer et comment concilier, au niveau d'une seule structure, tant de paramètres? Une solution raisonnable pour tenter de rassembler une grande partie de ces critères est l'utilisation des polymères de synthèse. Ces polymères sont synthétisés à partir d'un squelette hydrocarboné qui est progressivement transformé, pour obtenir une macromolécule qui devrait finalement se présenter avec les potentialités maximales vis à vis du processus de dissolution et l'adhérence bactérienne.

CHAPITRE II

SYNTHESE DES POLYMERES

INTRODUCTION

II.1. SYNTHESE DES POLY(ETHYLENEIMINES) (PEI) LINEAIRES

II.1.A. Les PEI

II.1.B. Synthèse des chlorhydrates de PEI

II.1.C. Synthèse des fluorhydrates de PEI

II.2. ALKYLATION ET FONCTIONNALISATION DES PEI

II.2.A. Monométhylation

II.2.B. Greffage paraffinique

II.2.C. Acétylation

II.3. QUATERNISATION FONCTIONNELLE DES PEI

II.3.A. Diméthylation

II.3.B. N,N méthyl-acétylation

II.3.C. N,N méthyl-phosphorylation

II.4. PEI QUATERNAIRES DE STRUCTURE HETEROGENE

II.4.A. Copolymères de PEI méthyl-paraffine acétylés

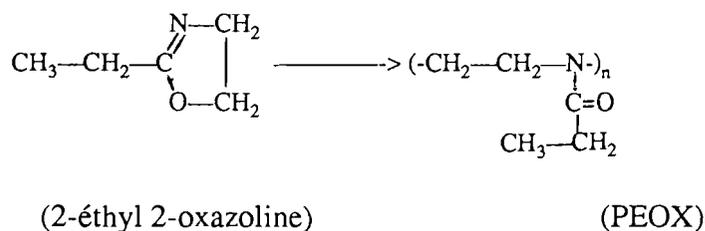
II.4.B. Copolymères de PEI méthyl-paraffine phosphorylés

CONCLUSION

INTRODUCTION

L'adsorption des polymères de synthèse sur l'hydroxyapatite est susceptible de modifier non seulement ses modalités de dissolution en milieu acide, mais également les interactions de surface qui favorisent la fixation des protéines salivaires et par conséquent celle des bactéries. La succession des différentes étapes des synthèses est orientée par les critères d'efficacité découlant du modèle de dissolution présenté initialement. Les modifications structurales des polymères permettront d'évaluer progressivement leur impacts sur le processus de dissolution.

Les polymères que nous allons synthétiser sont des macromolécules azotées, et en particulier des polyéthylènes imines (PEI). Ces PEI sont obtenues par hydrolyse acide des polyéthylloxazolines (PEOX), elles-mêmes synthétisées par polymérisation cationique de la 2-éthyl 2-oxazoline. Cette polymérisation se fait par une ouverture de cycle selon le schéma suivant:



Les PEOX à partir desquelles nous synthétiserons les PEI nous ont été généreusement fournies par la société *Dow Chemical*. Ces PEOX avaient déjà elles-mêmes fait l'objet d'une étude pour leur incidence sur l'inhibition de la dissolution de l'hydroxyapatite; mais les résultats semblaient plutôt indiquer une action catalytique, et donc contraire à l'effet attendu (*Thomann, 1989*).

Pour notre étude, nous réaliserons des synthèses progressives au cours desquelles la PEI linéaire sera modifiée par alkylation au niveau de l'azote, soit par greffage des groupements méthyles ou des chaînes paraffiniques, soit par greffage de courtes chaînes terminées par des fonctions acides (carboxylique et phosphonique). Si ces modifications structurales isolées peuvent produire des effets intéressants sur la dissolution des hydroxyapatites, leurs combinaisons dans une même molécule seraient logiquement génératrices d'une amplification de tels effets. Dans cette perspective, nous synthétiserons des composés PEI de structure hétérogène par alkylation et greffage des chaînes à fonctions acides, créant ainsi des sites quaternaires dans le polymère. Nous associerons ainsi dans une seule molécule des éléments qui favoriseront l'adsorption du polymère, tout en augmentant la charge protonique moléculaire.

Des combinaisons avec d'autres inhibiteurs connus de la dissolution sont également à envisager, en espérant qu'elles accentueront de manière significative l'effet du polymère sur ce processus.

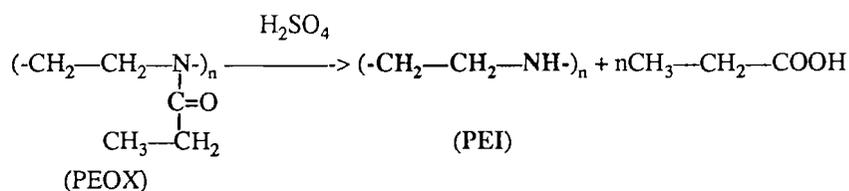
Les possibilités de quaternisation nous conduiront à réaliser des couplages électrostatiques entre les sites protonés des polymères et des ions fluorures. Nous pourrons, grâce à de tels couplages, analyser les éventuels effets combinés sur le processus de dissolution des hydroxyapatites.

II-1. SYNTHÈSE DES PEI LINEAIRES.

II-1.A. LES PEI

Les PEI linéaires sont synthétisées par hydrolyse acide des PEOX de masses moléculaires respectives 5×10^4 , 2×10^5 et 5×10^5 .

Ces synthèses se font selon le schéma réactionnel suivant:



II-1.A.1. Mode opératoire.

Dans un tricol de 1000ml, 99g (0,98mole) de PEOX, 70ml (2,5moles) d'acide sulfurique(H_2SO_4) concentré (95%) et 200ml d'eau permutée sont chauffés à 106°C sous agitation. Du fait du chauffage, l'eau s'évapore et entraîne sous forme d'un azéotrope l'acide propionique formé lors de l'hydrolyse. Afin de maintenir constant le volume du milieu réactionnel, au fur et à mesure de l'évolution de l'hydrolyse, une quantité d'eau égale au volume de l'azéotrope recueilli est rajoutée au moyen d'une ampoule à addition.

La réaction est considérée comme terminée lorsque les vapeurs qui se dégagent ne sont plus acides (vérification au papier pH).

Pour chacune des trois hydrolyses réalisées, 6 jours ont été nécessaires. L'acide sulfurique est alors neutralisé à chaud par une solution de soude à 50%, puis le contenu du tricol est transvasé dans un bécher de 1500ml. En refroidissant, la PEI devient insoluble; et après trois heures, deux phases se séparent dans le bécher:

- une phase insoluble blanche flottante, la PEI,
- une phase aqueuse renfermant le sulfate de sodium et l'excès de soude.

La PEI est récupérée par filtration, rincée abondamment à l'eau distillée jusqu'à ce que les eaux de lavage ne soient plus basiques (vérification au papier pH), puis lyophilisée.

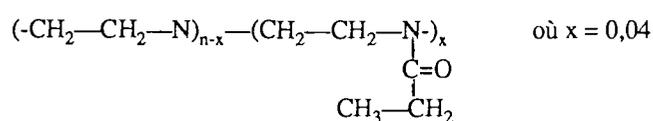
II-1.A.2. Résultats.

Nous avons en moyenne récupéré 40 g de chacun des trois produits d'hydrolyse obtenus à partir des trois différentes masses moléculaires de PEOX, soit un rendement de 96%. L'analyse élémentaire, aux erreurs expérimentales près, est la même pour les trois masses de PEI; elle se traduit comme ci-dessous, en pourcentages des différents éléments.

calculé: C: 55,78; H: 11,70; N: 32,52.

analyse: C: 53,04; H: 11,47; N: 29,08.

La comparaison des rapports C/N (% de carbone/% d'azote) calculés et trouvés permet d'évaluer le degré d'hydrolyse des PEOX. Ces valeurs sont respectivement de 1,715 et 1,824, soit un taux d'hydrolyse 96%. Une formulation rigoureuse des produits de ces hydrolyses exige de les présenter selon la formule ci-dessous:



Considérant la valeur élevée (96%) du taux d'hydrolyse, nous assimilerons dès à présent les polymères obtenus à la PEI linéaire qui a pour formule:



En relation avec la PEOX d'origine, nous les désignerons respectivement par PEI 50, PEI 200 et PEI 500.

Remarque: Le rapport C/N est une valeur fondamentale qui, tout au long de ces synthèses, permettra l'évaluation du degré de transformation des polymères.

II-1.A.3. Propriétés des PEI linéaires.

Les PEI, dans la gamme des masses moléculaires obtenues, présentent les propriétés suivantes:

- insolubilité dans l'eau froide, due à une forte cristallinité
- existence des formes hémihydrates, sesquihydrates et dihydrates à cause de leur caractère fortement hygroscopique (*Chatani, 1983*)
- formation des complexes avec les métaux comme le cuivre, le nickel, le zinc (*1956; Rivas et coll., 1985*). Ces propriétés complexantes sont dues à la présence des doublets électroniques libres sur les atomes d'azote, conférant au polymère les caractéristiques d'une base de Lewis vis à vis des cations métalliques ayant des orbitales atomiques vacantes;
- forte expansion en raison du caractère polybasique favorisant une répulsion mutuelle des charges après une protonation partielle (Cette expansion serait de l'ordre de 65% à pH 5, *Lindquist et coll., 1976*);
- existence d'une hélice double brins pour les PEI anhydres, mise en évidence par des études aux rayons X (*Chatani et coll., 1982*). Les PEI constituent ainsi le premier exemple de polymère synthétique en hélice à double chaînes, stabilisée par des liaisons hydrogènes. (Fig. II-1).

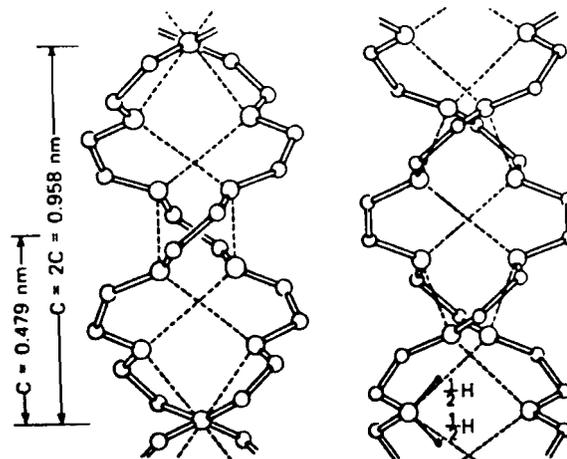


Figure II-1: Hélice en double brins de la PEI linéaire (*Chatani et coll., 1982*)

Pour nos expériences les polymères doivent être solubles à froid et de conservation facile. Nous avons pour cela synthétisé les chlorhydrates et fluorhydrates de PEI. Par ces synthèses, nous pourrions analyser les effets inhibiteurs du polymère couplé avec chacun des ions et voir dans quelle mesure une association entre polymère et anions inorganiques peut être utilisée dans la prévention de la carie.

II-1.B. SYNTHÈSE DES CHLORHYDRATES DE PEI.

II-1.B.1. Mode opératoire

Le mode opératoire décrit dans ce paragraphe est le même pour toutes les PEI linéaires et les PEI modifiées.

La PEI est mise en solution dans un minimum de 250ml d'éthanol absolu sous reflux. Nous ajoutons goutte à goutte de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré à 33% jusqu'à ce que le pH soit proche de 1 (vérification au papier pH). Après refroidissement du bécher dans un bain eau/glace pendant 2 à 3 heures, le polymère sous forme de chlorhydrate ayant précipité est filtré puis mis à sécher dans un dessiccateur.

II-1.B.2. Résultats

Les polymères secs se présentent sous forme de poudre blanche. Le rendement quantitatif n'a pas été évalué pour la simple raison que le but dans cette étape était une protonation en vue de la conservation et de solubilisation. L'analyse élémentaire des PEI protonées donne les pourcentages suivants:

Composition PEI,HCl calculée: C: 30,21; H: 7,60; N: 17,61; Cl: 44,58.

PEI 500 analyse: C: 30,00; H: 7,56; N: 16,35; Cl: 41,08.

La valeur expérimentale du rapport Cl/N (2,51) correspond dans ce cas à une protonation totale.

PEI 200 analyse: C: 29,98; H: 7,54; N: 16,34; Cl: 39,02.

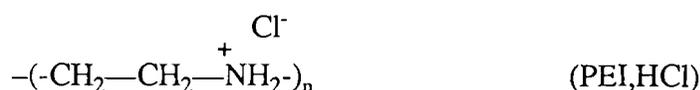
Avec un rapport Cl/N de 2,39, le taux de protonation est de 94,3%.

PEI 50 analyse: C: 29,40; H: 7,58; N: 16,02; Cl: 38,93.

Le rapport trouvé Cl/N est de 2,43, soit une protonation de 96%.

Remarque: Avec les PEI linéaires, nous obtenons une protonation maximale, alors que dans le cas des PEI branchées et selon *Dick et Ham* (1970), le taux de protonation de la PEI atteint difficilement 81%. Ils expliquent cette limitation par les fortes interactions de voisinage des charges tout au long de la chaîne du polymère.

Les polymères sous forme chlorhydrate correspondent donc à la formule:



II-1.C. SYNTHÈSE DES FLUORHYDRATES DE PEI

II-1.C.1. Mode opératoire

La synthèse des fluorhydrates de PEI se fait selon le même mode opératoire que celle des chlorhydrates. Nous utilisons pour cela de l'acide fluorhydrique (HF) concentré à 42%.

II-1.C.2. Résultats

Le polymère sous forme de fluorhydrate est une poudre blanche cristalline. Les pourcentages calculés et expérimentaux des différents éléments correspondent aux valeurs suivantes:

Composition PEI, HF calculé: C: 38,09; H: 9,59; N: 22,21; F: 30,11.

PEI 500 analyse: C: 35,63; H: 7,25; N: 19,53; F: 8,40.

Le rapport F/N (0,43) correspond à un taux de protonation de 31,7%.

PEI 200 analyse: C: 36,54; H: 7,83; N: 20,03; F: 9,37.

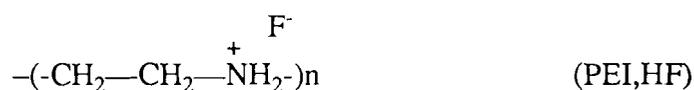
F/N = 0,47, signifiant une protonation de 35%.

PEI 50 analyse: C: 33,78; H: 7,68; N: 18,52; F: 16,84.

Nous obtenons un rapport F/N de 0,909, donc une protonation de 67%.

Remarque: le degré de protonation varie de manière caractéristique avec l'agent utilisé. Si avec l'acide chlorhydrique les taux de protonation sont excellents, il n'en est pas ainsi avec l'acide fluorhydrique, quelle que soit la masse moléculaire de la PEI linéaire. Une explication possible de ce phénomène serait la différence de taille entre Cl et F.

Les PEI linéaires sous la forme de fluorhydrate ont pour formule:



Les tests préliminaires de dissolution en présence des chlorhydrates de PEI ayant montré un effet plus marqué avec le dérivé PEI 500, il sera seul retenu pour la suite des synthèses au cours desquelles des greffages seront réalisés.

II-2. ALKYLATION ET FONCTIONNALISATION DES PEI

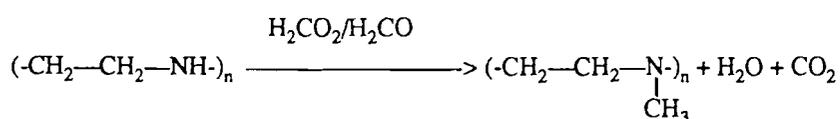
Le greffage des chaînes hydrocarbonées plus ou moins longues sur un polymère tel que la PEI linéaire augmente son encombrement stérique, accroît le champ des interactions hydrophobes et crée, après protonation, des secteurs de charges relativement stables pouvant favoriser son adsorption sur une surface solide.

Dans cet objectif, nous avons synthétisé la PEI monométhylée, et la PEI paraffinée. L'adsorption d'une macromolécule est d'autant plus forte que celle-ci peut établir avec l'adsorbant des liaisons chimiques. Nous avons essayé de favoriser ces liaisons en greffant sur la PEI des chaînes hydrocarbonées à fonctions carboxyliques et phosphoriques.

II-2.A. MONOMETHYLATION DE LA PEI

Le greffage des groupements méthyles (-CH₃) sur la PEI linéaire confère au polymère un léger encombrement stérique, éventuellement bénéfique pour son adsorption et à la création des charges positives plus ou moins permanentes après protonation.

La monométhylation de la PEI 500 a été réalisée selon la méthode de *Eschweller-Clarke*, décrite par *Tanaka* (1983). Cette méthylation se déroule suivant le schéma réactionnel suivant:



Le produit de cette réaction sera désigné PEI.Me

II-2.A.a. Mode opératoire

Dans un tricol de 1000ml, 13g de PEI (0,302 mole), 200ml de formaldéhyde (H₂CO) à 30% et 50ml d'acide formique (H₂CO₂) sont chauffés à 115°C sous agitation magnétique pendant 5 jours. La température est baissée à 50°C pendant 1 heure puis la solution est transvasée dans un ballon de 1000ml pour évaporer le solvant. Cette opération est suivie d'une reprise du produit dans l'éthanol absolu à 60°C puis d'une filtration. Après évaporation de l'éthanol, le produit est dissous dans 60ml d'eau distillée puis lyophilisé. Nous avons obtenu 15,34g de polymère, soit un rendement de 89%.

Le polymère a été divisé en fractions A, B et C. La fraction A (12,5g) a été conservée pour la suite des synthèses. Les fractions B et C sont directement chlorhydratées et fluorhydratées.

II-2.A.1. Synthèse du chlorhydrate de PEI N-méthylée.

Le mode opératoire est identique à celui appliqué aux PEI linéaires (voir II-1.B). Le polymère obtenu sera désigné (PEI.Me,HCl).

II-2.A.2. Synthèse du fluorhydrate de PEI N-méthylée.

Cette synthèse se déroule de la même manière que celle des fluorhydrates de PEI linéaires (voir II-1.C). Le produit de synthèse de cette étape est désigné (PEI.Me,HF).

Contrairement aux PEI linéaires, les PEI monométhylées protonées ne précipitent pas dans l'éthanol. Pour les récupérer, nous avons eu recours à la technique de l'extraction liquide-liquide avec le chlorure de méthylène (CH_2Cl_2), suivie de la précipitation dans un solvant, l'éther.

Dans une ampoule à décanter de 1000ml, 200ml de CH_2Cl_2 et la fraction de PEI choisie sont agités pour bien homogénéiser. Après 1 heure de décantation, la phase organique est récupérée, séchée sur du sulfate de sodium (Na_2SO_4), puis filtrée. Par évaporation, son volume est réduit à environ 25ml et ajouté goutte par goutte à 1500ml d'éther distillé en passant à travers une colonne de sable de Fontainebleau et du coton de verre (purification supplémentaire). Au fur et à mesure que les gouttes de la solution de polymère arrivent dans l'éther, il apparaît un précipité qui se dépose ensuite au fond du bécher. La précipitation terminée, l'éther est transvasé dans un ballon et évaporé. Le précipité et les traces de produit restées dans le ballon sont récupérés séparément, puis séchés au dessiccateur..

II-2.A.b. Résultats

A la pesée nous obtenons 15,34g de produit, soit un rendement de 89%. L'analyse élémentaire des polymères monométhylés et protonés donne les valeurs suivantes, en pourcentages:

PEI.Me: calculé: C: 63,11; H: 12,36; N: 24,53.

analyse: C: 58,47; H: 11,19; N: 22,40

C/N expérimental vaut 2,567, soit un taux de méthylation de 99,35%.

PEI.Me,HCl calculé: C: 38,52; H: 8,62; N: 14,96; Cl: 37,89.

analyse: C: 36,92; H: 8,56; N: 14,06; Cl: 33,92.

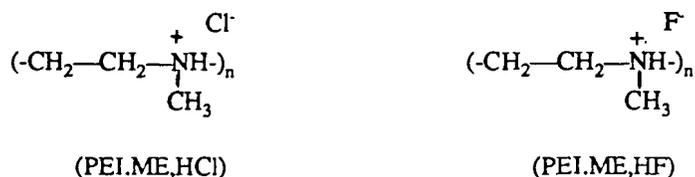
La comparaison des rapports Cl/N calculé (2,53) et trouvé (2,41) permet d'estimer le taux de protonation par HCl à 92,3%.

PEI.Me,HF calculé: C: 46,74; H: 10,46; N: 18,17; F: 24,63.

analyse: C: 38,09; H: 8,98; N: 14,92; F: 17,15.

Le rapport F/N expérimental (1,15) comparé à la valeur calculée (1,36) correspond à une protonation par HF d'environ 85%.

La méthylation a été confirmée par un spectre RMN. Compte tenu de la concordance des valeurs théoriques et expérimentales, les produits obtenus correspondent donc aux polymères que nous voulions synthétiser. Leurs formules peuvent alors s'écrire:

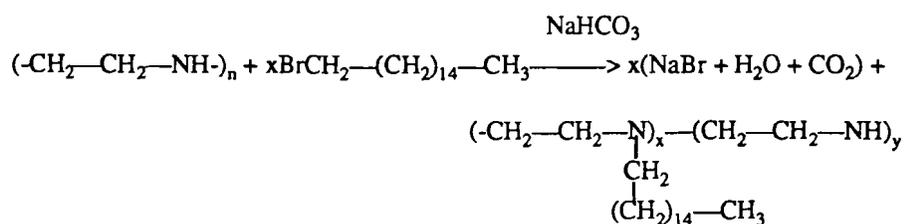


II-2.B. GREFFAGE D'UNE CHAÎNE PARAFFINIQUE SUR LA PEI

Une chaîne paraffinique est hydrophobe; elle modifie de manière substantielle l'encombrement stérique et la géométrie du polymère sur lequel elle est greffée. En présence d'une surface adsorbante comme l'hydroxyapatite, elle établit des interactions physiques (interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes ...) dont l'énergie totale est suffisante pour permettre une adsorption quasi irréversible du polymère (*Joao et coll.*,1990). Le greffage d'une telle chaîne à un taux élevé peut facilement rendre le polymère insoluble. Cette insolubilité est encore plus facilement atteinte avec la PEI.

Pour nos recherches, nous avons donc limité les greffages à des taux de 3,5 et 7%, ceci afin d'étudier l'effet quantitatif des chaînes latérales, en restant dans les limites de solubilité du polymère. Le composé paraffinique utilisé est l'hexadécane ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}$) qui est sous forme de 1-bromo-hexadécane ($\text{Br}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$).

Cette alkylation se fait selon la relation suivante:



II-2.B.a Mode opératoire

Le protocole de synthèse utilisé est une adaptation du protocole décrit par *Rivas et coll.* (1985).

Dans un ballon de 250ml, 40ml de tétrahydrofurane (THF), 2g (0,0465mole) de PEI et 1g (0,0119 mole) de bicarbonate de sodium sont chauffés à 70°C sous agitation magnétique pendant 30 minutes. On y ajoute 1ml de 1-bromohexadécane, quantité suffisante pour avoir un taux de greffage de l'ordre de 7%. Le chauffage est maintenu pendant 22 heures, temps au bout duquel le ballon est refroidi sous un filet d'eau du robinet, de manière à évaporer le THF au Rotavapore.

Le résidu est repris dans 40ml d'eau distillée, puis chauffé à nouveau à 70°C pendant 1 heure. Après refroidissement, le produit est filtré, rincé plusieurs fois à l'eau distillée. Le polymère obtenu est alors divisé en deux parties qui serviront à la synthèse du chlorhydrate et du fluorhydrate.

Le polymère greffé à 3,5% est synthétisé suivant la même méthode mais en ajoutant 0,5 ml de 1-bromo-hexadécane.

II-2.B.1. Synthèse du chlorhydrate

Le chlorhydrate de poly(N-hexadécane) PEI est synthétisé d'après la méthode décrite au paragraphe II-1.B..

II-2.B.2. Synthèse du fluorhydrate

Le fluorhydrate de poly(N-hexadécane) PEI est synthétisé selon le protocole décrit au paragraphe II-1.C..

II-2.B.b. Résultats

Pour le dérivé alkylé à 7%, nous obtenons 1,38g du chlorhydrate et 1,22g du fluorhydrate; par rapport aux estimations théoriques, les rendements quantitatifs sont respectivement de 82% et de 79,7%. Cette évaluation n'a pas été faite pour le polymère alkylé à 3,5%.

La purification de ces polymères a été assez longue en raison de leur faible et lente solubilisation, et plus particulièrement pour les fluorhydrates. Dans les présentations des données qui vont suivre, G_x indique simplement le taux de greffage théorique.

L'analyse élémentaire de ces polymères donne les résultats suivants:

PEI G_7 HCl: calculé: C: 39,35; H: 8,72; N: 14,70; Cl: 37,26.

analyse: C: 38,18; H: 8,15; N: 13,92; Cl: 34,06.

PEI G_7 HF: calculé: C: 47,57; H: 10,54; N: 17,78; F: 24,11.

analyse: C: 45,76; H: 9,95; N: 16,68; F: 24,15.

Le rapport C/N pour ces dérivés est de 2,74 alors que la valeur calculée est 2,67; le taux d'alkylation peut donc être estimé à 7,5%.

PEI.G₃HCl: calculé: C: 34,53; H: 8,13; N: 16,23; Cl: 41,11.

analyse: C: 33,34; H: 7,23; N: 14,78; Cl: 36,89.

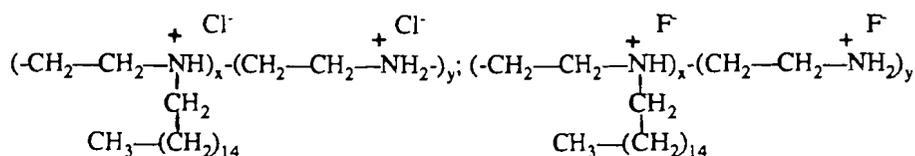
PEI.G₃HF: calculé: C: 42,27; H: 10,04; N: 20,06; F: 27,23.

analyse: C: 38,82; H: 9,88; N: 17,21; F: 27,25.

Pour cette série le rapport C/N est 2,25 tandis que la théorie prévoit 2,22.; le greffage s'est donc effectué à un taux de 3,94%.

Les écarts des taux de greffages sont en relation avec les erreurs sur la précision des pipettées du 1-bromo-hexadécane.

Les PEI ainsi greffées, sous forme chlorhydrate et sous forme fluorhydrate ont pour formules:



(PEI.G_xHCl)

(PEI.G_xHF)

où x = 0,04 ou 0,075 et y = 0,96 ou 0,925.

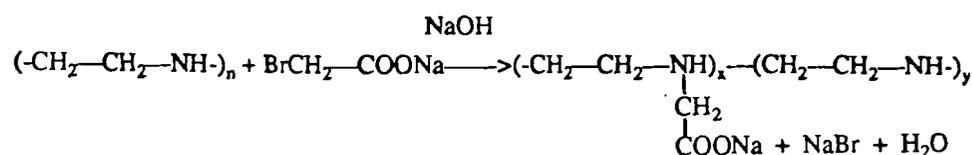
Les tests de solubilisation instantanée de ces polymères dans l'eau sont satisfaisants dans l'ensemble, mais sont meilleurs avec la PEI greffée à 3,9% sous ses deux formes. Les polymères fluorés se mettent plus lentement en solution que les chlorés.

II-2.C. N-ACÉTYLATION DE LA PEI

Le greffage d'un carboxylate à un taux déterminé sur la PEI permet d'augmenter la solubilité du polymère. Les groupements carboxyliques confèrent au polymère des propriétés chélatantes qui sont importantes tant pour l'adsorption que pour des interactions ioniques lors de la cristallisation des composés phosphocalciques.

Le taux de greffage doit être tel que, après chélation, le polymère ne précipite pas par excès de complexes PEI-Ca-PEI. Pour éviter cette précipitation, nous avons envisagé un greffage au taux théorique de 30%, quantité nous ayant apparue moyenne pour nos conditions expérimentales.

La N-acétylation de la PEI se fait selon la réaction suivante:



II-2.C.a Mode opératoire

Le dérivé carboxylique utilisé est le 1-bromo-acétate de sodium. (Br-CH₂-COONa).

Dans un ballon de 500ml, 5g(0,116 mole) de PEI linéaire, 100ml d'eau distillée sont chauffés 70°C. sous agitation magnétique. Lorsque la PEI est totalement dissoute, 6,23g (0,0387mole) de 1-bromo-acétate de sodium et 1,55g (0,0387mole) de soude sont ajoutés. Le chauffage est maintenu pendant 18 heures.

Après refroidissement, le produit est dialysé pendant 48 heures puis l'eau est évaporée. Le résidu obtenu est dissous dans 100 ml d'éthanol absolu, filtré. Après évaporation de éthanol le produit est mis à sécher dans le dessiccateur. Le polymère sec est pesé, puis divisée en trois fractions A, B et C:

- la fraction A est conservée sans modification supplémentaire,
- les fractions B et C sont respectivement transformées en chlorhydrate et en fluorhydrate.

II-2.C.1. Synthèse du chlorhydrate

La synthèse du chlorhydrate de PEI N-acétylée s'opère conformément à la méthode décrite au paragraphe II-1.B..

II-2.C.2. Synthèse du Fluorhydrate

La méthode de synthèse est présentée au paragraphe II-1.C..

II-2.C₂. Résultats

Pour le polymère acétylé, nous récupérons 5,56g de produit, soit un rendement de 75,3%. Après transformation en chlorhydrate en fluorhydrate, l'analyse élémentaire des produits synthétisés donne les valeurs suivantes:

PEIAc: calculé: C: 45,87; H: 9,33; N: 20,57; O: 14,10; Na:10,13.

analyse: C: 42,53; H: 8,56; N: 18,82; O: 12,53; Na: 9,64.

PEIAc.HCl: calculé: C: 30,15; H: 6,13; N: 13,53; Na: 6,66; Cl:34,24

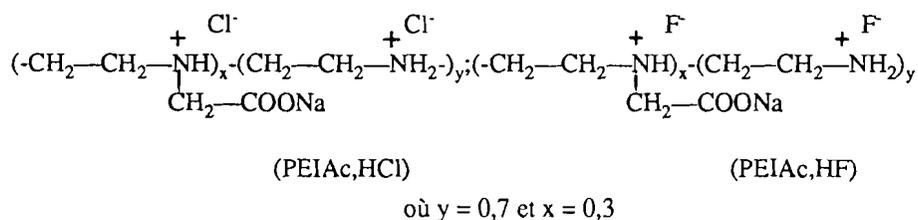
analyse: C: 28,73; H: 5,07; N: 12,70; Na: 5,13; Cl: 30,05

PEIAc.HF: calculé: C: 35,86; H: 7,30; N: 16,085; Na: 7,92; F: 20,81

analyse: C: 30,12; H: 6,67; N: 13,32; Na: 6,35; F: 21,79

De cette analyse élémentaire, il apparaît un rapport C/N moyen de 2,26 contre 2,23 calculé. L'acétylation s'est donc réalisée à 31,77%. La protonation s'est également bien produite, au regard des valeurs expérimentales de Cl et F. Les polymères obtenus sont donc ceux attendus pour ces synthèses. Nous ne faisons pas mention des pourcentages d'oxygène dans les chlorhydrates et fluorhydrates parce que l'analyse a des difficultés à les déterminer lorsque l'oxygène est en présence de sodium; il se forme dans ce cas des oxydes, ce qui rend aléatoire la détermination des taux d'oxygène dans le polymère synthétisé.

Nous avons, au cours de cette étape, synthétisé des polymères de formules:



II-3. QUATERNISATION FONCTIONNELLE DE LA PEI

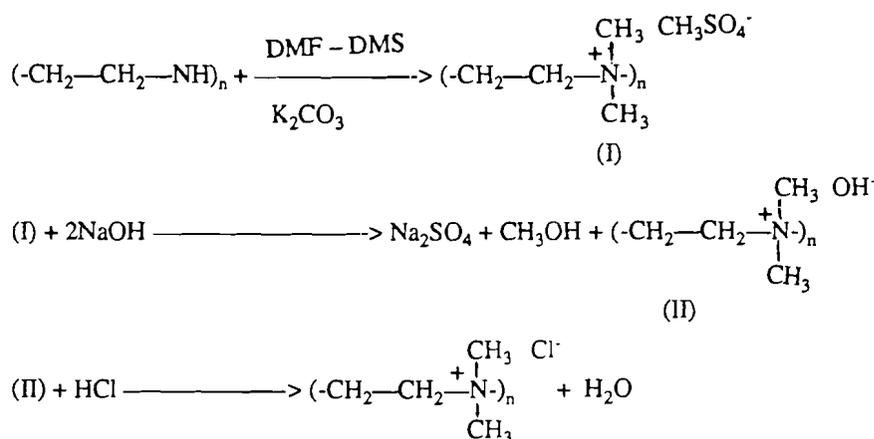
Pour améliorer l'expansion du polymère et favoriser son adsorption sur une surface solide comme l'hydroxyapatite, il est nécessaire de créer des charges permanentes sur le polymère et d'y adjoindre des structures pouvant établir des interactions physiques (liaisons hydrogènes, forces de Van der Waals, interactions hydrophobes) et des liaisons chimiques avec la surface. C'est pour cette finalité que nous avons synthétisé des dérivés quaternaires de la PEI. La quaternisation permet non seulement la création des charges, mais également le couplage interchangeable du polymère et d'un contre-ion pouvant avoir une action inhibitrice sur la dissolution de l'hydroxyapatite. La structure répétitive du polymère dans ces conditions fait de lui un poly(ammonium) quaternaire. En dehors de leurs possibilités inhibitrices de la dissolution d'après le modèle présenté plus haut, de telles molécules sont connues pour leurs propriétés antiseptiques et éventuellement tensioactives, si l'on y adjoint des chaînes hydrophobes qui ne limitent pas la solubilisation.

La synthèse des dérivés quaternaires de la PEI se fait soit par une diméthylation soit par greffage des chaînes à fonction acide sur le polymère préalablement méthylé. Si les polymères paraffinés d'une part et les quaternisés d'autre part peuvent individuellement donner des effets inhibiteurs, il est possible que leur combinaison dans une même structure moléculaire potentialise ces effets, permettant ainsi d'obtenir une molécule multifonctionnelle plus performante. Cette association sera réalisée au cours de la synthèse des copolymères de PEI. Ces opérations de quaternisation permettront aussi de créer des charges permanentes tout le long de la chaîne du polymère de telle

sorte que, lorsqu'il s'adsorbe sur l'apatite, le nombre de charges positives à l'interface augmente proportionnellement au degré de quaternisation. Si nos prévisions basées sur le modèle de dissolution sont exactes, nous aurons une inhibition importante, conformément aux critères d'efficacité d'un inhibiteur idéal.

II-3.A. Synthèse de la (N,N-diméthyl) PEI quaternaire.

La synthèse de la (N,N-diméthyl) PEI quaternaire se fait selon la série réactionnelle suivante:



II-3.A.a. Mode opératoire

Dans un tricol de 1000ml, 200ml de diméthylformaldéhyde (DMF) préalablement distillé sur oxyde de baryum (BaO), 5g (0,116 mole) de PEI sont dégazés pendant 45 minutes, puis 20g (0,145mole) de bicarbonate de potassium (K₂CO₃) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à 50°C pendant 15 minutes sous agitation magnétique. 30ml (0,32mole) de diméthylsulfate (DMS) sont injectés dans une ampoule à addition grâce à une seringue, puis ajouté goutte par goutte dans le tricol. La réaction se fait pendant 5 jours.

Au bout de ce temps, 100ml d'eau distillée sont ajoutés dans le milieu de manière à avoir un pH proche de la neutralité. Avec une solution de soude, le pH est remonté à 10 (vérification au papier pH). Après 6 heures le pH est ramené à 7 avec une solution de HCl à 33%. L'ensemble de ces opérations est destiné à neutraliser les traces éventuelles de DMS et de soude.

Le contenu du tricol est transféré dans un ballon de 1000ml pour évaporer la DMF et l'eau. Le résidu est repris dans 125ml de THF puis filtré, afin de séparer le polymère des sels inorganiques (peu solubles dans le THF). On évapore le THF. La même manipulation est effectuée deux fois dans l'éthanol absolu; le produit est finalement

dissous dans 125ml d'eau distillée, puis dialysé pendant 4 jours, temps au bout duquel la PEI est lyophilisée.

II-3.A.b. Résultats.

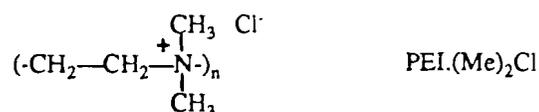
Le rendement de cette synthèse est médiocre (4%). Cela peut s'expliquer par des coupures de la PEI linéaire pendant la diméthylation, d'où une réduction importante de sa masse moléculaire, permettant donc le passage du polymère obtenu à travers les pores de la membrane de dialyse. Une synthèse supplémentaire a été réalisée et a conduit au même résultat.

La quantité de produit récupérée est malgré tout suffisante pour pouvoir réaliser les expériences préliminaires de dissolution. Par l'analyse élémentaire, nous avons obtenu les résultats suivants:

PEI.(Me)₂Cl: calculé: C: 44,66; H: 9,37; N: 13,02; Cl: 32,95.

analyse: C: 39,36; H: 8,81; N: 11,63; Cl: 29,44.

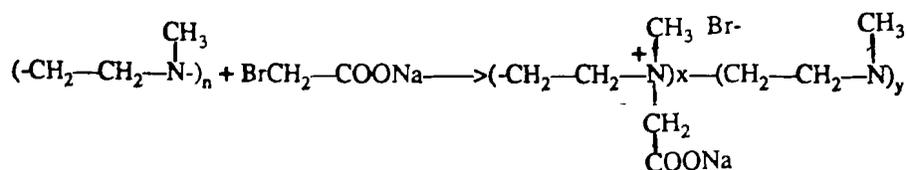
Le rapport C/N expérimental est 3,38 contre 3,43 prévu par la théorie. Nous pouvons, à partir de cette donnée estimer la diméthylation à 97,31%. Le polymère synthétisé correspond donc à la formule ci-dessous:



II-3.B. Synthèse de la poly (N,N-méthyl acétyl) PEI quaternaire

La synthèse de la poly (N,N-méthyl acétyl) PEIq permet de regrouper dans un même polymère les avantages des polymères précédents pris individuellement. Nous obtenons ainsi un polymère chargé, avec un encombrement stérique important, susceptible de s'adsorber fortement sur l'hydroxyapatite. La possibilité de couplage du polymère avec un contre-ion échangeable tel que F⁻ permet d'envisager la mise au point d'un nouveau vecteur de fluoration qui, par lui-même, peut présenter des propriétés antibactériennes en raison de la présence d'un pourcentage élevé d'ammoniums quaternaires dans sa structure.

La synthèse de ce type de polymère se fait en deux étapes dont une N-monométhylation suivie d'une N-acétylation. Ayant déjà synthétisé une PEI monométhylée (voir II-2.C.) la seconde réaction se fait selon l'équation suivante :



II-3.C.a. Mode opératoire

Dans un ballon de 100ml, 6ml d'eau, 1g (0,0175 mole) de PEI N-méthylée sont chauffés sous agitation magnétique, à 80°C. Après dissolution totale du polymère 0,85g (0,0053 mole) de 1-bromoacétate de sodium, 5ml d'eau et 1g (0,0097 mole) de bromure de sodium (NaBr) sont ajoutés. L'excès de bromure de sodium est destiné à éviter la formation d'un zwitterion entre $-\text{COO}^-$ et l'ammonium. Le chauffage est maintenu pendant 18 heures. La quantité de 1-bromoacétate permet d'obtenir un taux de greffage théorique de 30%.

Après refroidissement (1 heure) l'eau est évaporée, puis le produit dissous dans 75ml d'éthanol absolu. Le bromure de sodium (NaBr), peu soluble dans l'éthanol, précipite. Un filtrage permet de séparer NaBr du polymère. Cette opération est reproduite 4 fois afin de mieux séparer le polymère et les sels inorganiques. L'éthanol est évaporé, le produit récupéré est divisé en deux fractions A et B:

la fraction A est lyophilisée et conservée, la fraction B est transformée en fluorure par passage sur une résine échangeuse d'anions. Après cette opération, le produit est ensuite lavé trois fois dans le méthanol puis filtré autant pour le séparer des traces de fluorure de sodium et de NaBr. Une fois le méthanol évaporé au Büchi, le polymère fluoré est enfin lyophilisé.

II-3.C.a. Résultats

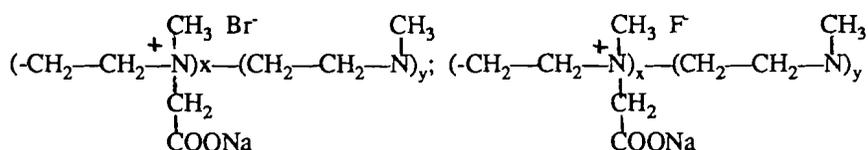
Nous n'avons pas évalué le rendement de ces synthèses, mais la quantité de polymère obtenue nous permet de penser que celui-ci est satisfaisant. L'analyse élémentaire du produit synthétisé sous la forme bromure et sous la forme fluorure donne les valeurs suivantes:

PEIMeBrA: calculé: C: 41,03; H: 7,27; N: 13,29; Na: 6,55; Br: 22,75
analyse: C: 38,50; H: 7,01; N: 12,38; Na: 6,04; Br: 21,17

PEIMeFA: calculé: C: 49,64; H: 8,79; N: 16,08; Na: 7,92; F: 6,54
analyse: C: 42,85; H: 8,17; N: 13,78; Na: 8,32; F: 8,14.

L'examen du rapport C/N de ces polymères montre une valeur de 3,11, un peu plus élevée que 3,09 théorique. L'acétylation de quaternisation s'est donc réalisée à 31,3%. De plus il est resté des traces de NaF dans le polymère, vu le léger surplus de Na et F révélé par l'analyse. Ces quantités sont assez faibles pour ne pas avoir de répercussions significatives sur notre étude.

Les polymères synthétisés correspondent aux formules suivantes:



(PEI.MeBrA) = PEI.AGPC 1

(PEI.MeFA) = PEI.AGPC 2

avec $x = 0,3$ et $y = 0,7$.

Nous obtenons ici un polymère à unités de base dans les proportions indiquées par les données de l'analyse ($x = 0,313$; $y = 0,687$). Ces polymères correspondent donc aux dénominations suivantes:

- 1) Poly (bromure de N,N-méthyl acétyl PEIq) co (N-méthyl PEI).
- 2) Poly (fluorure de N,N-méthyl acétyl PEIq) co (N-méthyl PEI).

(q = quaternaire)

Pour faciliter la désignation de ces polymères, nous les classons sous les sigles suivants:

PEI.AGPC 1 pour le dérivé couplé au Br⁻

PEI.AGPC 2 pour celui qui est couplé au F⁻.

II-3.D. Synthèse de la poly (N,N-méthyl éthanol phosphate) PEIquaternaire

Les résultats préliminaires de l'action des dérivés quaternaires comportant des chaînes carboxylées ayant apparus intéressants, nous avons voulu faire un essai comparatif entre de tels dérivés et ceux dont les chaînes se terminent par des phosphates. Pour rester dans une base de comparaison quantitative, nous avons phosphorylé la PEI.Me (synthèse très difficile) au taux théorique de 30%.

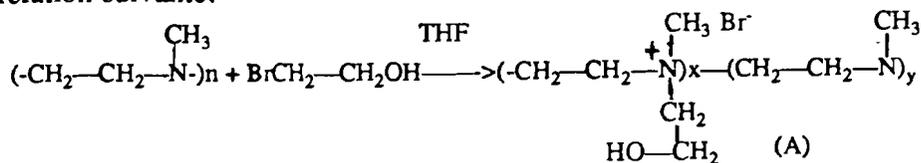
II-3.D.a Mode opératoire

Le protocole de phosphorylation adopté dans ces synthèses est une modification de celui mis au point par *Ferrel et coll. (1948)* pour phosphoryler des protéines dont certains acides aminés sont hydroxylés (sérine, thréonine, hydroxyproline). Comme dans la PEI N-méthylée il n'y a pas d'hydroxyl, il nous a fallu initialement greffer sur le polymère une structure à deux carbones (proche de l'acétate), se terminant par un OH; nous avons pour cela choisi le 2-bromo-éthanol (Br-CH₂-CH₂-OH).

La phosphorylation se fait donc en deux étapes: le greffage du 2-bromo-éthanol, et la phosphorylation proprement dite.

II-3.D.a.1. Greffage du bromo-éthanol sur la PEIME

La réaction de greffage du bromo-éthanol sur la PEI N-méthylée se fait selon la relation suivante:



* Dans un ballon de 250ml équipé d'un réfrigérant, 3,6g (0,063 mole) de PEI N-méthylée, 2,3g (0,0184 mole) de bromo-éthanol, 5ml d'eau permutée et 75ml de THF sont chauffés à 60°C sous agitation magnétique pendant 4 jours. Le ballon est refroidi, puis le THF est évaporé au Büchi. Le produit obtenu est rincé deux fois dans 50 ml de toluène, puis filtré. Une dernière évaporation permet d'éliminer le toluène de manière à sécher le produit au dessiccateur.

* Nous avons récupéré 5,66g de produit greffé, soit un rendement de 95%. Un spectre RMN du proton et une analyse élémentaire dont les résultats sont présentés ci-dessous ont confirmé que le produit obtenu était bien celui attendu, c'est le poly (bromure de N,N-méthyl éthanol PEIq) co (N-méthyl PEI). Nous le désignerons par PEIMeEtOH; son analyse élémentaire donne les résultats suivants:

PEI.MeEtOH: calculé: C: 45,72; H: 9,06; N: 14,81; O: 5,07; Br: 25,34.

analyse: C: 44,17; H: 8,75; N: 14,16; O: 4,85; Br: 24,10.

Le rapport C/N expérimental est de 3,12, alors que le calcul prévoit 3,33; le greffage du bromo-éthanol s'est donc réalisé au taux de 32%.

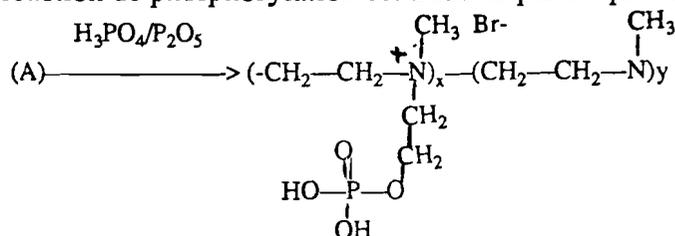
II-3.D.a.2. Phosphorylation

La phosphorylation du polymère ci-dessus synthétisé est une réaction d'estérification. Comme toute réaction de ce type, elle est limitée par l'eau qui en est l'un des produits. Pour augmenter le rendement d'une telle réaction, il est indispensable d'éliminer l'eau au fur et à mesure qu'elle se forme. En accord avec le protocole préconisé par les auteurs, l'agent de phosphorylation utilisé dans cette opération est un mélange de 100g d'acide phosphorique (H_3PO_4) à 85% et 75g de diphosphore pentaoxyde (P_2O_5). Lors de la réaction entre l'acide phosphorique et le bromo-éthanol, P_2O_5 réagit avec l'eau pour régénérer H_3PO_4 . Le mélange est agité jusqu'à la dissolution totale de P_2O_5 (exothermique), puis laissé refroidir pendant 3 heures.

* Dans un bécher de 200ml, 5g (0,053mole) de PEIMeEtOH et 80g du mélange phosphorylant sont additionnés, puis agités avec une spatule en verre.

Pour faciliter la dissolution du polymère et accélérer par la même occasion la réaction, on chauffe le bécher avec un sèche cheveux. Lorsque tout le polymère est dissous, le bécher est placé en atmosphère sèche, en présence de P_2O_5 pendant 6 jours. Pendant les 3 premiers jours, le milieu réactionnel est agité plusieurs fois avec une spatule de verre et chauffé en même temps.

La réaction de phosphorylation est traduite par l'équation suivante:



Pour récupérer le polymère phosphorylé ainsi synthétisé, nous réalisons deux précipitations dans l'acétate d'éthyle, après avoir vérifié que le mélange phosphorylant ne précipite pas dans ces mêmes conditions. Il suffit pour cela de mettre environ 1,5l d'acétate d'éthyle dans un bécher de 2l et d'y ajouter goutte par goutte le mélange réactionnel, tout en agitant. Après précipitation on filtre puis le polymère est dissous dans l'eau permutée pour être neutralisé par une solution de soude. L'excès de sel formé par les éventuelles traces d'acide phosphorique et le sodium est éliminé par dialyse pendant 24 heures. Après avoir réduit par évaporation le volume d'eau, le polymère est lyophilisé.

Nous avons opté pour une neutralisation post-extractive afin d'éviter une formation massive de sels qui aurait rendu difficile la récupération du polymère.

II-3.D.b Résultats

Par la pesée, nous avons obtenu 3,28g de polymère phosphorylé, soit un rendement de 78,5%. Etant donné que nous ne savions pas si la réaction avait eu lieu, nous avons dans un premier temps vérifié la structure de la molécule par spectrométrie RMN du proton. La confirmation structurale étant faite, une analyse élémentaire nous a donné les valeurs suivantes:

PEImeP:calculé: C: 32,83;H: 6,27; N: 10,48; P: 7,02; Br:18,20;Na:10,48

analyse: C: 31,69;H: 6,11; N: 10,00; P: 7,62; Br:15,34;Na:11,43

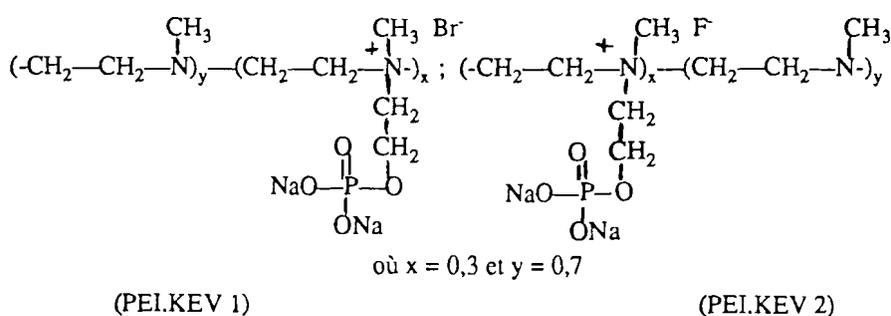
Ces résultats montrent une présence excédentaire de phosphore, de sodium et d'oxygène ainsi qu'une diminution de brome. La valeur en oxygène est assez difficile à interpréter dans la mesure où, en présence de sodium, les techniques d'analyse donnent des valeurs moyennes à cause de la formation des oxydes.

La diminution de la valeur en brome avec l'augmentation de celle du phosphore laisse envisager la possibilité de formation d'un zwitterion qui du reste, n'aurait en principe pas d'interférence avec les expériences dissolution.

Le rapport C/N est de 3,17 alors que la théorie prévoit 3,77. Cette valeur n'est pas significativement différente de celle obtenue après greffage du bromoéthanol. Nous pouvons donc conclure que la phosphorylation a bien eu lieu et de plus, elle n'a pas altéré le squelette porte-greffon.

Comme précédemment, une partie du polymère synthétisé a été transformée en fluorure par passage sur une résine échangeuse d'anions. Le rapport C/N n'a pas varié et l'analyse a donné un taux de fluor de 5,03%, alors que l'on s'attendait à 5,09.

Les polymères phosphorylés dans cette synthèse ont pour formules:



Les polymères synthétisés ont pour dénomination:

- 1) Poly (bromure de N,N-méthyl éthanolphosphate PEIq) co (N-méthylPEI)
- 2) Poly (fluorure de N,N-méthyl éthanolphosphate PEIq)co (N-méthylPEI)

Pour simplifier la classification, les polymères synthétisés dans cette étape seront respectivement désignés par:

PEI.KEV 1 pour celui dont le contre-ion est Br⁻

PEI.KEV 2 pour celui qui est couplé au F⁻

II-4. Synthèse des copolymères de PEI quaternisée de structure hétérogène

Au cours des synthèses précédentes, nous avons préparé des dérivés alkylés et fonctionnalisés de la PEI. Si de telles molécules sont susceptibles d'être à l'origine d'effets inhibiteurs individuels importants, leur regroupement dans une même structure macromoléculaire ne peut que les potentialiser et accentuer par conséquent l'intérêt des polymères de synthèse.

Une association de ce type met en présence toutes les interactions indispensables à l'obtention d'un effet inhibiteur maximal, en se basant sur les critères d'efficacité préalablement définis à partir de notre modèle.

Les potentialités de ces macromolécules seront d'autant plus importantes qu'elles seront couplées aux ions connus pour leurs propriétés inhibitrices. L'effet résultant sera donc multifactoriel, en accord avec le caractère multifonctionnel de la macromolécule.

Nous avons, dans cette recherche des effets associatifs, synthétisé deux familles de copolymères comportant une combinaison alkyle et carboxyle puis alkyle et phosphoryle sur la PEI.

Pour chaque dérivé, nous réalisons d'abord l'alkylation par le greffage du bromohexadécane au taux théorique de 5% sur la PEI préalablement N-méthylée, et l'on termine par la carboxylation ou la phosphorylation à 30%. Nous procédons donc à une synthèse séquencée de ces dérivés, en suivant les protocoles précédemment décrits. Chaque dérivé est divisé en deux lots dont l'un est fluoré par passage sur une résine échangeuse d'anions.

* L'analyse élémentaire de ces copolymères quaternisés de structure hétérogène donne les résultats suivants:

combinaison alkyles – carboxyles

PEIMeG₅BrAc: calculé: C: 43,84; H: 7,73; N: 11,61; Br:23,29; Na: 5,71
analyse: C: 39,82; H: 7,02; N: 10,03; Br:22,23; Na: 5,19

PEIMeG₅FAc: calculé: C: 53,21; H: 9,39; N: 14,1; F: 6,69; Na: 6,94
analyse: C: 50,31; H: 8,87; N: 17,72; F: 6,60; Na: 6,75

combinaison alkyles – phosphoryles

PEIMeG₅BrP:calculé: C: 40,40; H: 7,7; N: 10,3; Br:20,6; O: 14,1; P:6,8
analyse: C: 37,42; H: 6,8; N: 9,98, Br:18,37;O:14,42;P:6,94

PEIMeG₅FP: calculé: C: 42,04;H: 7,9; N: 11,14; F:5,29; Na:10,97;P:7,39
analyse: C: 39,78;H: 8,63; N: 10,60; F: 5,01;Na:11,2;P:7,55

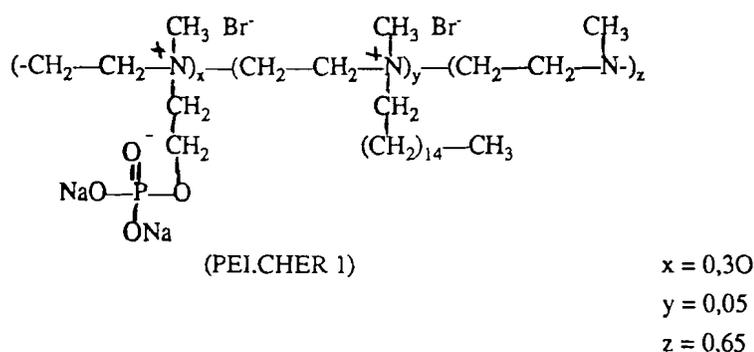
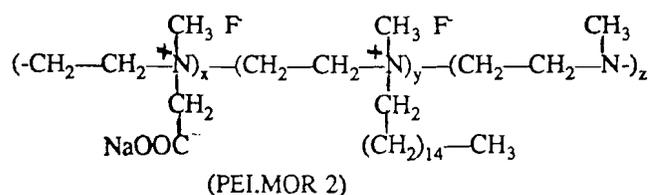
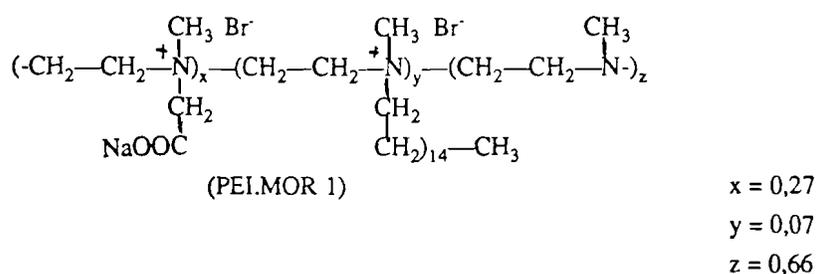
N.B. Dans ces analyses, les résultats relatifs à l'oxygène ne sont pas systématiquement présentés car la formation des oxydes de sodium lors des procédures d'analyse rend aléatoires les valeurs trouvées pour l'oxygène. Il n'y a cependant pas de raison objective qui mettrait en doute la présence de l'oxygène dans nos échantillons.

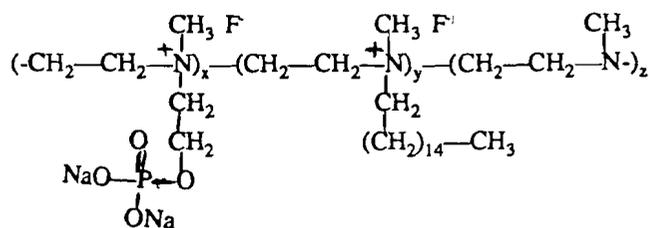
Les données des analyses, particulièrement les valeurs de C/N montrent que les synthèses désirées ont eu lieu. Pour la combinaison alkyle – carboxyle, C/N vaut 3,97, alors que par le calcul, la valeur 3,77 est prévue. Partant de cette donnée et grâce à des calculs appropriés, il ressort des analyses que le polymère synthétisé comporte en réalité: 7% d'alkyles, 27% de carboxyles et 66% de PEIme.

Pour la combinaison alkyle – phosphoryle, nous trouvons un rapport C/N de 3,75 contre 3,92 théorique. En suivant la même démarche que ci-dessus, il apparaît que le polymère est compartimenté de la manière suivante: alkyles: 5%; phosphoryles: 30%; PEIme: 65%.

Malgré ces légères déviations (liées aux erreurs de précision des pesées et de prélèvements des réactifs) par rapport aux valeurs théoriques, nous pouvons admettre que les polymères synthétisés sont ceux envisagés. Par les taux de Na et P, on peut dire qu'il serait resté à l'état de traces au voisinage du polymère, malgré la dialyse réalisée pour les séparer.

Les polymères obtenus dans ces synthèses peuvent être représentés par les formules suivantes:





(PEI.CHER 2)

Les dénominations de ces polymères sont les suivantes:

- 1) Poly [bromure de (N,N-méthyl hexadécane PEIq) co (N,N-méthyl acétyl PEIq)] co (N-méthyl PEI).
- 2) Poly [fluorure de (N,N-méthyl hexadécane PEIq) co (N,N-méthyl acétyl PEIq)] co (N-méthyl PEI).
- 3) Poly [bromure de (N,N-méthyl hexadécane PEIq) co (N,N-méthyl éthanol phosphate PEIq)] co (N-méthyl PEI).
- 4) Poly [fluorure de (N,N-méthyl hexadécane PEIq) co (N,N-méthyl éthanol phosphate PEIq)] co (N-méthyl PEI).

Par souci de simplification et de facilité de prononciation, les copolymères synthétisés dans cette étape seront désignés:

* dans le cas des alkylés – carboxylés,

PEI.MOR 1 pour le dérivé dont le contre-ion est Br⁻

PEI.MOR 2 pour celui qui est couplé au F⁻

* dans le cas des alkylés – phosphorylés,

PEI.CHER 1 pour le couplage au Br⁻

PEI.CHER 2 pour le couplage au F⁻

Ces macromolécules sont en fait des copolymères comportant des ammoniums quaternaires (dont les contre-ions sont soit Br⁻, soit F⁻), des chaînes paraffiniques hydrophobes et des groupements chélateurs à base d'acides carboxylique et phosphorique, à côté desquels se situent des azotes à doublets libres, justifiant ainsi leur caractère multifonctionnel et hétérogène. La procédure de synthèse ne nous permet pas de savoir dans quel ordre se succèdent les greffons; nous considérons que leur distribution sur le porte-greffon est aléatoire.

CONCLUSION

Nous avons pu synthétiser divers dérivés de la PEI. Dans nos conditions expérimentales, les dérivés fluorés ont en général été assez difficiles à purifier. Ceci s'expliquerait par la faible solubilité des fluorures. Il fallait par conséquent des temps de précipitation et de dialyse plus longs que lors de la purification des dérivés chlorés ou bromés.

Dans l'ensemble, les polymères ont une pureté structurale de l'ordre de 97%, suffisante pour la réalisation des expériences de dissolution de l'hydroxyapatite. Tout au long de ces synthèses, notre démarche a consisté à introduire de façon progressive des modifications structurales sur le polymère de base, conformément aux données du modèle. Chaque transformation effectuée traduit au moins une caractéristique d'un inhibiteur idéal. La synthèse des copolymères à distribution spatiale aléatoire a permis la création de multiples sites à azotes quaternaires, faisant de ces molécules des poly (ammonium quaternaires). De telles structures sont connues pour leurs effets antibactériens. Ces polymères sont en fait des polycations qui, grâce à la présence des ammoniums et des groupements acides, ont les propriétés des échangeurs amphotères, avec des affinités ioniques pouvant favorablement influencer leurs capacités inhibitrices. Si nous espérons des effets inhibiteurs intrinsèques importants avec ces polymères, leur couplage aux ions fluorures dont ils serviront de vecteur ne peut que potentialiser cette inhibition. La présence délibérée d'une proportion importante d'azote à doublets libres laisse entrevoir des possibilités d'autoprotonation du polymère, de manière à servir comme modulateur des variations de pH. Sur le plan chimique, nous pouvons considérer les polymères synthétisés comme multifonctionnels et par conséquent susceptibles d'avoir de multiples applications. La poursuite de ce travail va maintenant consister à évaluer les effets induits par l'adsorption de ces polymères sur l'apatite, tant pour le processus de dissolution que sur les interactions avec les bactéries cariogènes de la plaque.

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

III-1. MATERIEL

III-1.A Montage expérimental

III-1.A₁ Le réacteur

III-1.A₂ Les instruments de mesure

III-1.A₃ Le dispositif d'enregistrement

III-1.B L'hydroxyapatite

III-1.C Les solutions

III-1.C.1. Solution de dissolution

III-1.C.2. Solution d'étalonnage

III-1.C.3. Solution d'ajustage de pH

III-2. METHODES

III-2.A Préparation des polymères

III-2.B Protocole expérimental

III-2.B.1. La phase de stabilisation

III-2.B.2. La phase de mise à l'équilibre

III-2.B.3. La phase de dissolution

III-2.B.4. Etalonnage de l'électrode

III-2.B.5. Evaporation

III-2.C Exploitation des données

III-2.C.1. Volume d'acide pour le saut de pH

III-2.C.2. Consommation de protons

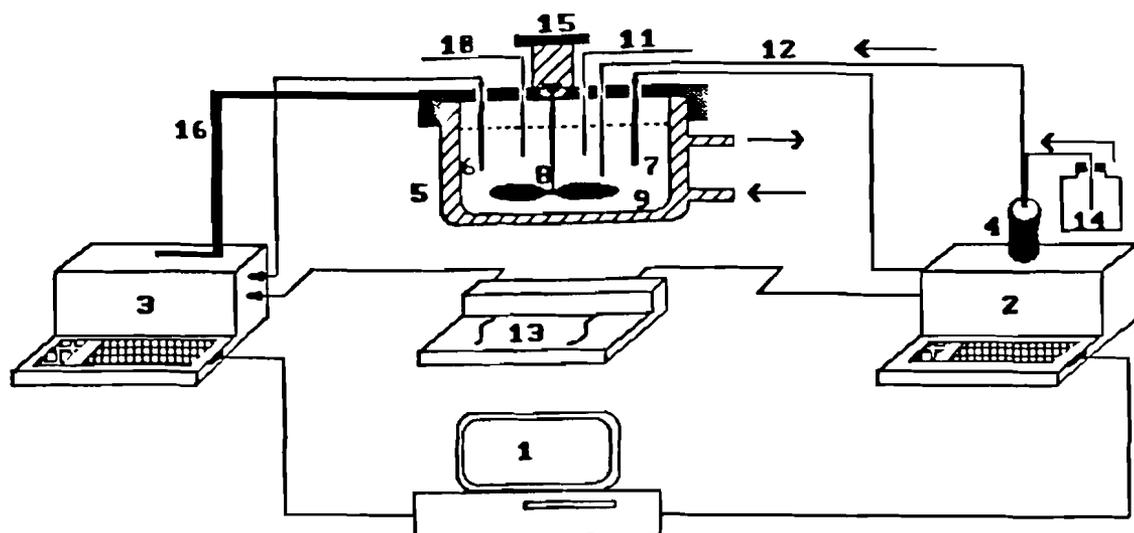
III-2.C.3. Libération de calcium

III-2.C.4. Fluorures en solution

III-1 MATERIEL

III-1.A Montage expérimental (figure III-1)

Le montage automatisé mis au point par *Thomann et coll.*(1990) pour la réalisation des expériences de dissolution comporte trois parties principales: le réacteur, les instruments de mesure, le dispositif d'enregistrement des mesures.



- | | |
|-------------------------------|-------------------------|
| 1- Microordinateur | 2- Mettler N° 1 |
| 3- Mettler N° 2 | 4- Burette automatique |
| 5- Réacteur | 6- Electrode de calcium |
| 7- Electrode de pH | 8- Tige d'agitation |
| 9- Hélice | 10- Circuit d'argon |
| 11- Thermomètre | 12- Circuit d'acide |
| 13- Enregistreur double piste | 14- Bouteille d'acide |
| 15- Moteur d'agitation | 16- Bras support |

Figure III- 1: Schéma du montage expérimental automatisé utilisé pour les expériences de dissolution de l'hydroxyapatite.

III-1.A.1. Le réacteur

Il est constitué par un vase à double paroi en verre pyrex, d'une contenance de 100ml et est muni d'un couvercle étanche comportant 8 orifices calibrés. La thermostation de ce réacteur est assurée par un système de circulation d'eau relié à un thermostat (Haake F₃ digital Berlin, Allemagne). Deux éléments supplémentaires sont rajoutés au réacteur, passant par deux des orifices:

– Un barboteur gazeux connecté à une bouteille d'argon. L'argon évite la carbonatation du milieu pendant l'expérience; son débit est réglé à 0,1 litre/minute.

– Une tige d'agitation à trois pales terminée par une hélice plastique; elle est entraînée par un moteur à vitesse réglable. La vitesse d'agitation est ajustée à la valeur désirée puis vérifiée à l'aide d'un tachymètre.

III-1.A.2. Les instruments de mesure

Les instruments de mesure utilisés dans nos expériences sont des potentiomètres couplés à des électrodes spécifiques.

* Les potentiomètres

– Ils sont constitués par deux unités compactes pH-stats Mettler DL 21 (Greipensee, Suisse) programmables. Une unité permet de suivre en continu les potentiels électriques liés aux activités ioniques du calcium ou des fluorures en solution. L'autre donne la lecture du pH du milieu et assure l'injection continue de l'acide nécessaire à la dissolution. Cette unité est par conséquent associée à une burette automatique de 5ml (Mettler DV 405) elle-même reliée par une tubulure spéciale à une bouteille d'acide de concentration déterminée.

* Les électrodes spécifiques

Elles sont au nombre de trois; mais pour des raisons techniques, nous ne pouvons réaliser simultanément que deux types de mesures.

– Une électrode combinée de pH en verre (modèle Mettler DG111-SC) comportant une partie mesure à réponse rapide et une partie référence. Cette électrode est remplie d'une solution de concentration 3M en KCl, saturée en AgCl (Ingold N° 209811250). Elle est stockée dans une solution spéciale fournie par le fabricant. La pente moyenne pour cette électrode, obtenue par étalonnage entre pH 4 et pH 7 (solutions fournies par le fabricant) pendant toute la durée de ce travail a été de $-60,03$. Comparée à la pente théorique qui est $-61,5$ à 37°C , cette valeur expérimentale montre que la pente fluctue peu.

Les mesures effectuées sont de ce fait reproductibles, même lorsque des intervalles de temps de trois à quatre semaines séparent des expériences. Sur le tableau III-1, sont représentées 10 valeurs représentatives des pentes de l'électrode de pH sur une durée de 2 ans.

Date	Pente	PX ₀
20/03/89	-60,05	6,93
22/05/89	-60,02	6,74
09/10/89	-60,01	6,73
18/12/89	-60,10	6,67
20/06/90	-59,96	6,75
30/08/90	-60,06	6,87
09/04/91	-60,03	6,90
30/04/91	-60,07	6,89
14/05/91	-60,05	6,91
30/05/91	-60,02	6,75
Moyenne	-60,03 ± 0,04	6,81 ± 0,09

Tableau III-1: Evolution de la pente de l'électrode de pH. PX₀ est la valeur correspondant à un potentiel nul.

– Une électrode de calcium comportant un corps (Orion Research, type 90-60, Cambridge, USA) et un embout à membrane sélective échangeuse d'ions (Orion Research, type 93-20). Nous la stockons dans une solution de CaCl₂ diluée (10⁻⁵M). Les données relatives à sa pente seront analysées plus loin.

– Une électrode de fluorure (Orion Research type 96-09) dont le corps est entouré d'une paroi de verre protectrice. Son stockage se fait dans une solution standardisée de fluorure de potassium, en rapport avec la concentration de la solution de fluorure qui est utilisée dans l'expérience. Ainsi, lorsque nous envisageons d'utiliser une concentration de 5ppm en fluorure pour une manipulation donnée, l'électrode sera stockée 24 heures à l'avance dans une solution de KF contenant 5ppm de F⁻.

Pour une série de quinze mesures utilisant des solutions de KF dont les concentrations s'échelonnent entre 0,5 et 300ppm en F⁻, nous avons obtenu pour cette électrode une pente moyenne de -59,61, proche de la pente théorique (-60,55).

Les valeurs expérimentales ayant permis de calculer cette pente moyenne sont représentées sur la figure III-2

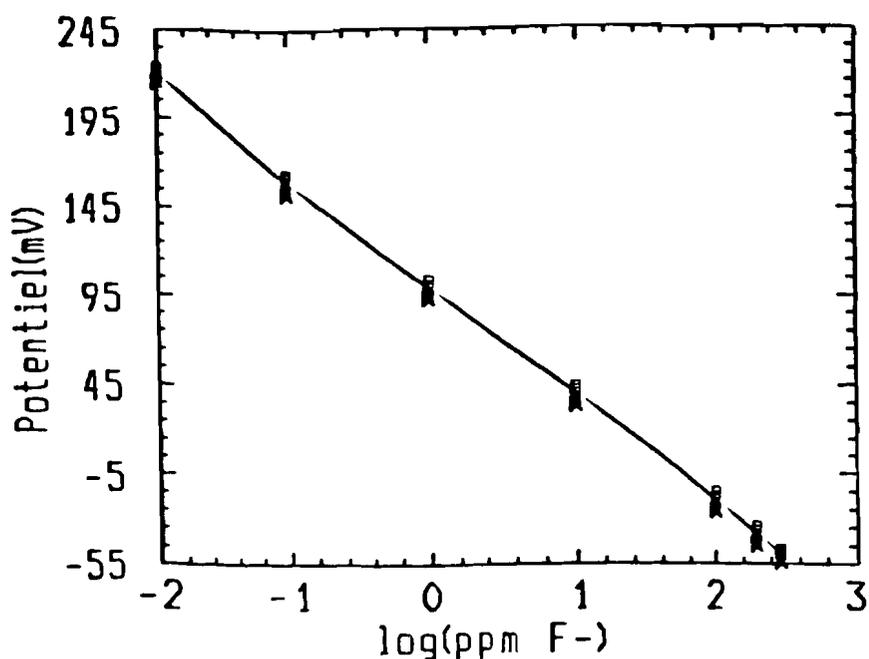


Figure III-2: Détermination de la pente de l'électrode de fluorure. La pente moyenne obtenue est $-59,61 \pm 0,15$

Pour toutes ces électrodes, la partie référence de l'électrode de pH sert en fait de base de référence pour tous les potentiels mesurés pendant une expérience. Les mesures peuvent être réalisées simultanément en utilisant une combinaison appropriée de deux électrodes spécifiques, en relation avec les objectifs expérimentaux (suivi du calcium libéré ou des fluorures en solution en combinaison avec la variation du pH).

III-1.A.3. Le dispositif d'enregistrement

Les données initiales et expérimentales sont enregistrés de deux manières différentes mais complémentaires. Nous utilisons pour cela:

- un enregistreur graphique double piste (LKB 2210-012, Broma, Suisse), qui permet de visualiser, en continu sur papier millimétré l'évolution de l'activité du calcium dans le réacteur, le pH ou le volume d'acide injecté, l'activité des ions fluorures en solution;

- un micro-ordinateur (Victor V 286) interfacé avec les deux unités compactes Mettler. La saisie des données à ce niveau se fait automatiquement. La procédure de saisie relève en fait d'un circuit de transmission par lequel les électrodes détectent et transmettent les valeurs expérimentales aux potentiomètres qui à leur tour, les transfèrent au micro-ordinateur de manière à les stocker en mémoire. La saisie se fait en continu, selon un intervalle de temps préalablement déterminé. En général un couple de valeurs est saisi



Figure III-3: Particules des plaquettes d'hydroxyapatite de synthèse observées au microscope électronique à balayage (x 700).

toutes les 5 secondes. Nous entendons par couple de valeurs les paires de données comme (t, pH), (t, mV) etc....

Le micro-ordinateur ne sert pas uniquement à la saisie et au stockage des données; il permet également l'analyse des valeurs expérimentales, grâce à des logiciels appropriés.

III-1.B L'hydroxyapatite

Les expériences de dissolution sont réalisées à l'aide d'une poudre d'hydroxyapatite de synthèse (HAS) ((Biogel HTP, Bio-Rad laboratories, Richmond, Californie, USA) de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Elle est synthétisée selon la méthode de *Tiselius et coll.*(1956). La poudre brute est tamisée (Tamisette OSI, Paris) pour ne retenir que les particules dont la taille est comprise entre 165 et 200 μm . Ces particules sont lavées trois fois au méthanol, rincées à l'eau distillée puis séchées à 40°C pendant 24 heures. Une étude au microscope électronique à balayage (JSM 35C) (figure III-3) montre que les particules d'hydroxyapatite ont une forme de plaquettes.

La surface spécifique de cet échantillon, déterminée par adsorption d'azote par le *Dr Eanes et Mr Haller* (NIDR-NIH, Bethesda, Maryland, USA) est de 45m²/g.

Le dosage du calcium par absorption atomique et le dosage du phosphate par la méthode de *Ames* (1966), suite à la destruction de 100mg de poudre d'apatite dans 100ml de HCl 1N montrent un rapport Ca/P de 1,61, proche de 1,67 prévu pour une composition stoechiométrique. Un produit de solubilité de $1,189 \times 10^{-60}$ a été défini pour cette apatite, à la suite d'une série d'expériences d'atteinte de l'équilibre thermodynamique (*Gramain et coll.*(1987)).

Le choix d'une hydroxyapatite de synthèse pour les expériences se justifie par son homogénéité structurale et surtout par l'absence d'éléments à l'état de trace. En fait, dans les apatites naturelles, il y a de nombreuses impuretés (*LeGeros*, 1981) qui sont susceptibles d'influencer le processus de dissolution (variation de la solubilité, de la cristallinité...). Une bonne compréhension et une analyse quantitative de la dissolution, nécessitent une limitation maximale des facteurs d'aspécificité.

La poudre d'hydroxyapatite est stockée dans un dessiccateur sous vide, en présence de CaCl_2 .

III-1.C Les solutions

Les solutions sont les milieux dans lesquels sont réalisées les expériences. Les sels (CaCl_2 , KH_2PO_4 , KCl , KF , NaF) à partir desquels ces solutions sont préparées sont de pureté analytique (Merck, quality pro Analysis, Darmstadt, RFA). L'eau employée pour la préparation de ces solutions est l'eau millipore.

Nous pouvons distinguer trois types de solutions: dissolution "D", étalonnage "E", d'ajustage des pH.

III-1.C.1. Solution de dissolution "D"

La solution "D" est le milieu dans lequel l'expérience est réalisée. Cette solution devrait posséder les mêmes caractéristiques que la salive, tant par sa viscosité que par sa composition. Un tel système est de réalisation délicate. Il est cependant connu que dans le milieu buccal, l'équilibre thermodynamique entre l'émail et le phase liquide est assuré par les ions phosphates et calcium du milieu salivaire (*Pellerin et coll.*, 1986). Nous avons de ce fait uniquement ajouté à la solution de dissolution un mélange de calcium et phosphate (ions contenus dans l'apatite) ainsi que du chlorure de potassium (KCl) pour maintenir la force ionique constante.

Pour ne pas induire de dissolution pendant la période de mise à l'équilibre, la composition de la solution "D" est définie à partir du produit de solubilité de l'apatite et du pH de mise à l'équilibre. Il sera possible de définir un produit ionique K_i de la solution "D", qui sera comparé au produit de solubilité K_{sp} de l'apatite. On s'arrangera pour que K_i soit sensiblement égal à K_{sp} .

Si l'on considère une demie maille d'hydroxyapatite [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$], son produit de solubilité est donné par la relation ci-dessous:

$$K_{sp} = (\text{Ca}^{2+})^5(\text{PO}_4^{3-})^3K_w(\text{H}^+)^{-1} \quad [33]$$

où $K_w = 2,388 \times 10^{-14}$, est le produit ionique de l'eau. Les parenthèses indiquent en fait des activités ioniques, mesurables par les électrodes. L'activité A_i de chaque ion i en solution est calculée par la relation suivante:

$$A_i = C_i \times f_i \quad [34]$$

avec: C_i = concentration et f_i = facteur d'activité de l'ion i .

Le facteur d'activité est lui-même calculé grâce à la loi de *Debye-Huckel*:

$$\log f_i = - \frac{A Z_i^2 \sqrt{\mu}}{1 + B a_i \sqrt{\mu}} \quad [35]$$

où μ est la force ionique de la solution, calculée par la relation

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i (Z_i)^2 \quad [36]$$

avec: Z_i = valence de l'ion i

A , B , a_i = Constantes qui dépendent de la température et la constante diélectrique du milieu. Selon *Moreno et coll.*, (1966) ces constantes prennent les valeurs suivantes:

$$a_i = \begin{cases} 6 \times 10^{-8} \text{ cm pour } \text{Ca}^{2+}; \\ 9 \times 10^{-8} \text{ cm pour } \text{H}^+; \\ 3,5 \times 10^{-8} \text{ cm pour } \text{OH}^- \\ 4 \times 10^{-8} \text{ cm pour les différentes formes ioniques du phosphate;} \end{cases}$$

$A = 0,522$ et $B = 0,331 \times 10^8$.

Connaissant la valeur du produit de solubilité K_{sp} de l'hydroxyapatite ($1,189 \times 10^{-60}$), il suffit de fixer la concentration du calcium en solution, choisir le pH de mise à l'équilibre afin de calculer les phosphates indispensables à l'obtention d'une solution équilibrée par rapport à l'apatite. Le choix de la concentration en calcium doit cependant prendre en compte la limite de lecture linéaire des potentiels par l'électrode spécifique. La concentration limite minimale suggérée par le fabricant de l'électrode est 10^{-5} M. Pour dépasser cette limite sans trop influencer la force ionique de la solution, la concentration en calcium a été fixée à $3,85 \times 10^{-5}$ M. En transformant la relation [32], nous pouvons donc écrire:

$$(\text{PO}_4^{3-}) = \frac{K_{sp}^{1/3} \times (\text{H}^+)^{-1}}{(\text{Ca}^{2+})^{5/3} \times K_w^{1/3}} \quad [37]$$

Par application de la relation [33], on calcule facilement les facteurs d'activité du calcium et du proton dans l'eau. Leur prise en considération dans la relation [35] conduit à la détermination l'activité du phosphate et par conséquent sa concentration. Cette démarche nous conduit à utiliser pour nos expériences une solution de KH_2PO_4 à 5×10^{-5} M.

La présence de différentes espèces ioniques en solution peut favoriser l'établissement d'un gradient de charges électriques qui influence fortement le transport des ions. Pour contourner ces perturbations, nous ajoutons du KCl dans la solution de dissolution. Possédant la même mobilité que les ions présents et éliminant le champs électrique, ce sel est par ailleurs sans effet sur la dissolution (*Gray*, 1962) jusqu'à une concentration de 8×10^{-1} M.

Compte tenu du fait que l'adsorption des polymères peut fortement être perturbée par le sel en solution (effet d'écran), nous avons opté pour une concentration de KCl de $1,12 \times 10^{-3} \text{M}$ de telle sorte que la force ionique de la solution de dissolution soit assez faible. Cette faible force ionique évite la formation d'un écran qui annihile la répulsion électrostatique au sein du polymère porteur de charges (*Belton et coll.*, 1983). La répulsion électrostatique des charges portées par les polymères sera ainsi conservée et permettra ensuite une adsorption en monocouche.

III-1.C.2. Solutions d'étalonnage "D" et "E"

Ces solutions sont utilisées pour la détermination de la pente de l'électrode de calcium pour chaque expérience. Nous estimons les fluctuations de cette pente afin de changer l'embout porteur de la membrane sensible de l'électrode lorsque les écarts entre des mesures successives deviennent trop importants par rapport à la pente théorique qui est de l'ordre de 30,75.

Les solutions d'étalonnage comprennent: la solution "D" (voir III-1.C₁) par laquelle nous déterminons le premier potentiel qui servira au calcul de la pente de l'électrode de calcium; une solution "E" de CaCl_2 de concentration à $5 \times 10^{-4} \text{M}$, puisque la pente se calcule au moins sur un écart de concentration d'un ordre de grandeur 10. Pour s'affranchir de l'effet de la force ionique sur la lecture du potentiel par l'électrode de calcium, la concentration de KCl est prise égale à celle de la solution de dissolution ($1,12 \times 10^{-3} \text{M}$).

III-1.C.3. Solutions d'ajustage des pH

Ce sont des solutions d'acide et base utilisées pour ajuster le pH à la valeur désirée. Elles sont préparées à partir de HCl et KOH (Titrisol) par dilution pour obtenir des solutions aux concentrations souhaitées. Pour les expériences de référence, nous utilisons HCl $3 \times 10^{-3} \text{M}$ et KOH $3 \times 10^{-3} \text{M}$; en présence de polymères, les concentrations respectivement employées sont $3 \times 10^{-2} \text{M}$ et 10^{-2}M . L'ajustage des petites variations de pH (variations de $\pm 0,2$ unité) se fait avec des solutions d'acide et de base utilisées pour les références). L'utilisation des solutions d'acide et de base plus concentrées en présence des polymères se justifie par le fait que ces polymères se protonent instantanément et retardent donc le déplacement des équilibres.

Les compositions des différentes solutions de dissolution, d'étalonnage et d'ajustage des pH sont résumées dans le tableau ci-dessous:

Solutions	CaCl ₂ (M)	KH ₂ PO ₄ (M)	KCl (M)
"D"	3,85x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁵	1,12x10 ⁻³
"E"	5x10 ⁻⁴	-	1,12x10 ⁻³
	3x10 ⁻³ M		3x10 ⁻³ M
Acide: HCl		Base: KOH	
	3x10 ⁻² M		1x10 ⁻² M

Tableau III-2: Composition des solutions utilisées pour les expériences de dissolution de l'hydroxyapatite.

III-2. METHODES

III-2.A Préparation des solutions de polymères

La solution de polymère dont le pouvoir inhibiteur sera testé est préparée 12 heures avant l'expérience. En fonction de la quantité totale du polymère disponible, nous préparons une solution mère concentrée à partir de laquelle des prélèvements sont faits. La concentration de cette solution mère est exprimée en masse de polymère pour un volume donné de solution "D". (voir sa composition sur le tableau III-2). Elle varie généralement entre 0,025 et 0,125g%.

Les quantités de polymère à mettre en solution pour l'adsorption sont estimées en se basant sur les études précédentes déjà réalisées avec d'autres polymères de synthèse dans ce système expérimental. Ce choix arbitraire provient de l'absence d'études sur l'adsorption des polymères de la famille des PEI sur l'hydroxyapatite. En rapport avec des études d'adsorption réalisées avec des composés de structure relativement proche par *Anbar et coll.* (1974) et *Pradip et coll.*, (1980) nous avons retenu les concentrations (0,005g%, 0,01g% et 0,05g%) qui devraient conduire au plateau de l'isotherme. *Pradip et coll.* (1980), étudiant l'adsorption des polyacrylamides sur l'hydroxyapatite, ont trouvé que le plateau de l'isotherme d'adsorption était de 0,024µg x cm⁻².

Il est à noter que les études aux concentrations de 0,01g% et 0,05g% n'ont été réalisées que pour certains polymères ayant donné des résultats intéressants dans l'inhibition de la dissolution.

Lors de la préparation des solutions de polymères, les dilutions sont indispensables dans la mesure où il est difficile de peser avec précision des quantités de l'ordre de 0,0025g, utilisables dans nos conditions expérimentales.

Préparation type d'une solution de polymère.

Considérons le polymère PEI.AGPC.1 (voir chap.II) que nous désirons obtenir à une concentration de 0,01g%, dans le réacteur. Dans un erlen de 75ml, nous ajoutons par l'intermédiaire d'un titrateur Mettler 50ml de la solution "D" (voir tableau II-1). Nous pesons ensuite 50mg de polymère que l'on introduit dans l'erlen. Nous obtenons ainsi une solution mère concentrée à 0,1g%. Après une agitation manuelle permettant une solubilisation rapide du polymère, il suffit de prélever à la pipette de précision 5ml de cette solution concentrée et les ajouter dans le réacteur, puis compléter le volume expérimental avec 45ml de la solution "D". Dans le réacteur, nous obtenons finalement 50ml de solution de dissolution avec une concentration en PEI.AGPC.1 à 0,01g%. Pour les autres conditions expérimentales, ces valeurs sont simplement adaptées afin d'atteindre les concentrations de polymère désirées dans le réacteur.

Lorsque le polymère est couplé aux ions fluorures, le procédé de préparation reste le même. Mais dans ce cas, l'évaluation de la concentration tient compte de la quantité de fluorures que renferme le polymère et susceptible de passer en solution. Les quantités de fluorures couplées aux différents polymères impliqués dans cette étude ont été estimées précédemment (voir chap.II). La concentration des ions fluorures à considérer pour une expérience est déterminée au départ à partir de la masse de polymère à mettre en solution. En reprenant le précédent exemple mais en utilisant la PEI.AGPC.2 renfermant 8,14% de F⁻ (en poids), lorsque nous utilisons le polymère à la concentration de 0,01g%, en supposant que tous les F⁻ couplés passent en solution, l'électrode spécifique des fluorures délivrera un potentiel équivalent à environ une activité de 8,14ppm de F⁻. Pour ces polymères, nous fixons donc d'abord la concentration du substrat organique et nous déduisons ensuite les fluorures correspondants, sans présumer de la quantité qui passera effectivement en solution. Les concentrations de F⁻ estimées à partir des solutions de polymères se situent entre 2,5 et 22ppm. Le passage en solution des ions F⁻ sera analysé plus loin.

Avant le prélèvement d'un volume xml de la solution de polymère, la solution mère est vigoureusement agitée pendant trois minutes afin de l'homogénéiser.

III-2.B Protocole expérimental

Une expérience de dissolution comporte 4 phases parmi lesquelles 3 sont indissociables. La dernière étape sert uniquement à l'étalonnage de l'électrode de calcium et le contrôle de la lecture de l'électrode de pH. Pour nos expériences, le volume de la solution de dissolution est initialement fixé à 50ml, quantité jugée suffisante afin d'avoir un rapport solide/liquide satisfaisant. La masse d'hydroxyapatite utilisée dans toutes les manipulations est de 10mg. L'agitation est réglée à 1000rpm.

III-2.B.1. La phase de stabilisation

Après avoir fixé la concentration expérimentale du polymère précédemment préparé, le pH stat (Mettler DL 21) est programmé pour injecter un volume V_{ml} égal à $(50 - x)ml$ de la solution "D" dans le réacteur où plongent les électrodes; (x représente le volume de la solution de polymère à utiliser). L'agitation est réglée à 1000rpm et la température à 37°C. Lorsque le potentiel de calcium et la température sont stabilisés, le pH est ajusté à la valeur choisie pour la dissolution (dans ces expériences, c'est pH 5) par addition à la pipette Pasteur de KOH ou de HCl (une série de mesures nous a permis d'estimer qu'une goutte de solution à la sortie de la pointe d'une pipette de ce type représente un volume d'environ $3 \times 10^{-2}ml$). Ces gouttes rajoutées sont prises en compte dans l'établissement du bilan final des variations de volume au cours de l'expérience. Cette phase dure en moyenne une heure. La stabilisation est l'étape d'évaluation de la réponse des électrodes; elle permet aussi un contrôle de la qualité des solutions; enfin elle constitue la borne inférieure de l'étalonnage de l'électrode de calcium. Lorsque les réponses des électrodes sont suffisamment stables, on note le potentiel lu par l'électrode de calcium ainsi que le pH, la durée totale de l'étape et les volumes des solutions de HCl et/ou de KOH utilisés. Généralement, le pH à la fin de la phase de stabilisation se situe entre 4,98 et 5,02, alors que le potentiel lu par l'électrode de calcium varie entre -42 et $-39.6mV$.

III-2.B.2. La phase de mise à l'équilibre

A la fin de la période de stabilisation, quelques gouttes de KOH sont ajoutées dans le réacteur pour faire passer le pH à 7. Après une lecture stable des activités ioniques pendant au moins 20 minutes, on ajoute x ml de la solution du polymère dans le réacteur. L'addition de cette solution s'accompagne généralement d'un changement brusque du pH et du potentiel du calcium lus. Le changement de pH, plus marqué avec les PEI renfermant des amines secondaires et tertiaires protonées tant sous forme HCl que HF, est le résultat d'une déprotonation partielle du polymère lors de sa mise en solution, conformément à l'élimination de Hoffmann.

Il suffit alors d'ajouter des gouttes de KOH concentré pour réajuster le pH à la valeur choisie pour la mise à l'équilibre (pH 7). Il est à signaler ici qu'il est rare que le pH se stabilise exactement à cette valeur; des fluctuations de l'ordre de 0,2 unité de pH sont sans influence sur le processus et sont donc acceptées. La stabilisation du pH à cette valeur est généralement assez longue à atteindre car le polymère a toujours tendance à libérer lentement des protons en solution après neutralisation de la déprotonation initiale rapide. On continuera donc à rajouter du KOH jusqu'à la stabilisation du pH. La durée moyenne d'attente de la stabilisation est d'environ 1 heure. Après ce temps et lorsque les réponses des électrodes de calcium et de pH sont stables, 10mg de poudre d'apatite de synthèse sont ajoutés dans le réacteur. Cette addition de la poudre d'apatite s'accompagne d'une petite variation de pH. Les variations du potentiel délivré par l'électrode de calcium sont fonction du type de polymère utilisé. C'est pendant cette phase de mise à l'équilibre que se fait l'adsorption du polymère sur l'apatite.

III.2.B.2.A. L'adsorption des polymères

Rappel: Lorsqu'une macromolécule dissoute rencontre une interface solide, elle s'adsorbe presque toujours, les cas de parois répulsives étant rares (*Schmitt*, 1983). Cette adsorption dépend de la structure du polymère, selon que celui-ci est un homopolymère linéaire ou d'architecture plus complexe, un polyélectrolyte faible ou fort, polyampholytes, un copolymère alterné, bi ou multiséquencé, etc....

Au niveau d'une interface, l'adsorption d'un polymère se fait de diverses manières, en fonction de ses caractéristiques, celles de la surface et celles du solvant (bon ou mauvais solvant). Dans l'état adsorbé, un polymère présente des zones de contact intime avec la surface (trains) des zones intermédiaires entre les trains et sont sans contact avec la surface (boucles) et en bout de chaîne, on trouve des queues qui sont des expansions du polymère dans la solution. L'adsorption sera d'autant plus irréversible que le nombre de trains est élevé. Elle se caractérise par une isotherme qui traduit en fait la cinétique de l'adsorption qui est conditionnée par l'affinité entre la surface (adsorbant) et la polymère (adsorbat). Le plateau de l'isotherme détermine la quantité maximale de polymère adsorbable par unité de surface de l'adsorbant et correspond à un état d'équilibre.

Le processus d'adsorption est influencé par la masse moléculaire et plus encore par le pH qui conditionne dans certains cas la densité de charge du polymère ainsi que celle de l'adsorbant. En principe, la quantité de polymère adsorbée sera d'autant plus grande que la masse moléculaire est importante.

Les incidences de la masse moléculaire et du pH varient également avec l'état de surface de l'adsorbant. Ainsi dans une étude de l'adsorption à pH 4,5 de PEI de différentes masses moléculaires sur la cellulose (surface spécifique $3\text{m}^2/\text{g}$), *Horn et coll.* (1978) trouvent que sur une surface poreuse, l'adsorption des polymères dont les masses moléculaires sont faibles est plus importante, c'est à dire: (2mg/g pour $M_w = 2000$; 1mg/g pour $M_w = 500000$). Ce résultat s'explique par le fait que les polymères de petites masses s'incrustent dans les pores et les quittent difficilement. Pour l'adsorption sur du polystyrène (surface spécifique = $2,8\text{m}^2/\text{g}$), ces auteurs trouvent pour $M_w = 500000$, une adsorption de l'ordre 1mg/g. *Lindquist et coll.*, (1976) avaient trouvé sur la silice Ludox AM dont la surface spécifique est de $190\text{m}^2/\text{g}$, une adsorption à saturation pour la PEI ($M_w = 18000$) de $0,261\text{mg}/\text{m}^2$ à pH 7. Sur une surface comme celle de l'apatite, l'adsorption a lieu, mais varie en fonction des caractéristiques du polymère, à un pH donné. En étudiant l'adsorption des polyacrylamides sur l'apatite, *Pradip et coll.* (1980) trouvent que le plateau de l'isotherme d'adsorption se situe à $0,024\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Ce bref rappel permet de montrer que l'adsorption des polymères est fonction d'un nombre considérable de paramètres qui, pour être analysé de façon détaillée, nécessite des études particulières qui sortent du cadre de ce travail.

Aucune donnée n'a pu être trouvée dans la littérature où l'adsorption de ce type de polymère (PEI) a été étudiée sur une surface telle que l'apatite.

La synthèse de dérivés quaternaires par alkylation et fonctionnalisation de la PEI permet de réduire l'influence du pH sur la charge globale dans la mesure où un nombre élevé de charges positives permanentes se trouve sur le polymère. Cette association structurale permet d'espérer obtenir une importante adsorption.

A partir du moment où la poudre d'apatite est ajoutée dans le réacteur, la durée moyenne d'obtention d'une réponse stable des électrodes est de l'ordre de 2 heures. Au terme de ce temps expérimental, on peut considérer que le processus d'adsorption est achevé.

III-2.B.3. La phase de dissolution

A la fin de la phase de mise à l'équilibre, le potentiel détecté par l'électrode de calcium ou par celle des fluorures et le pH sont notés. Ce pH est généralement de l'ordre de $7 \pm 0,03$. Les pH-stats utilisés sont dotés d'une gamme de paramètres expérimentaux qui sont: la concentration de l'acide utilisé pour la dissolution, la pente de l'électrode de pH, le volume maximal d'acide injectable au cours de la dissolution, le pH de dissolution, le temps théorique pour le saut de pH.

Toutes ces données sont transmises automatiquement au micro-ordinateur. Il reste alors à programmer la durée totale de la dissolution et à vérifier si les paramètres retenus sont corrects pour initier le programme de saisie automatique et débiter la cinétique.

Les valeurs numériques des principaux paramètres expérimentaux utilisés pour la réalisation des cinétiques de dissolution de ce mémoire sont données sur le tableau III-3.

[HCl]	pH _{fe}	pH _d	V _{max}	T _d (sec.)	T _{spH} (sec.)
3x10 ⁻² M	7±0,03	5	20ml	12000 à 25000	3

Tableau III-3: Principaux paramètres expérimentaux utilisés pour initier une expérience de dissolution. pH_{fe} = pH fin équilibre; pH_d = pH de dissolution. V_{max} = volume maximal d'acide que le pH stat pourrait injecter (détermination arbitraire); T_d = durée maximale de la dissolution; T_{spH}= durée maximale théorique pour le saut de pH; ce temps est impossible à déterminer à l'avance pour les expériences avec les polymères.

Le choix de pH 5 comme pH de dissolution se justifie par la recherche des conditions expérimentales les plus proches de ce qui a lieu dans le milieu buccal. Dès 1940, *Stephan* avait montré que le pH limite ou pH critique à partir duquel la dissolution de l'émail débute est pH 5,5. Le passage après atteinte de l'équilibre thermodynamique de pH 7 ± 0,03 à pH 5 perturbe totalement cet équilibre en solution et engendre le processus de dissolution. A pH 5 la cinétique de dissolution est suffisamment rapide pour que le processus soit suivi aisément dans notre système expérimental.

La concentration de l'acide (3x10⁻²M) est choisie de telle sorte que, lors du changement de pH, le volume d'acide soit le plus faible possible. Elle doit être également être suffisante pour déplacer les équilibres en solution, sans provoquer de surtitrage. L'addition d'un incrément d'acide doit permettre de maintenir le pH à une valeur très proche du pH de dissolution. Les fluctuations autour du pH de dissolution sont de l'ordre de 0,05 unité.

La dissolution proprement dite commence par une injection rapide commandée par ordinateur de l'acide dans le réacteur. L'incrément des volumes est croissante jusqu'à ce que le pH fixé pour la dissolution soit atteint. Notons à cet effet que l'incrément minimum est de 25x10⁻³ml. Malgré cette automatisation, il est rare que l'injection rapide de l'acide pour le saut de pH conduise exactement au pH de dissolution. Nous arrivons généralement à une valeur proche de 4,83. De même, si la durée maximale théorique pour le saut de pH est respectée lors des expériences de référence, il n'en est pas ainsi quand nous utilisons des polymères.

Dans ce cas, ce temps est d'environ 1 minute 30 secondes quand le polymère est à la concentration de 0,005g%(m/v). L'augmentation de la concentration rallonge ce temps; ainsi pour une concentration de 0,01g%, ce temps est d'environ 2 minutes et il atteint des valeurs de l'ordre de 4 à 5 minutes pour une concentration de 0,05g%. Ces temps sont observés pendant le saut de pH et ne peuvent pas être déterminés à l'avance. Nous analyserons plus loin les raisons et l'intérêt potentiel de ce prolongement du temps de changement de pH en présence des polymères.

Dès que la valeur du pH de dissolution est atteinte, l'injection de l'acide n'aura lieu que lorsque la valeur fixée du pH sera dépassée de +0,01 unité. La saisie se fera automatiquement sur l'ensemble de la durée expérimentale programmée.

A la fin de cette phase, la solution contenue dans le réacteur est prélevée au moyen de deux seringues préalablement tarées, puis pesée. On évalue ainsi le volume final dans le réacteur et par conséquent l'évaporation. En fonction du type d'expérience le volume final se situe entre 48,5ml et 54ml.

III-2.B.4. Etalonnage de l'électrode de calcium

L'étalonnage de l'électrode se fait par deux points expérimentaux qui encadrent la phase de dissolution. Le premier point est obtenu par le potentiel du calcium à la fin de la stabilisation à pH 5. Le second point est obtenu à la fin de la dissolution comme décrit ci-dessous.

Après avoir soigneusement lavé le réacteur et les électrodes, un volume de 50ml de la solution "E"(tableau III-2) est injecté par le pH stat. La solution est agitée à 1000rpm et lorsque la température est stabilisée à 37°C, le pH est ajusté à la valeur du pH de dissolution (pH 5). L'agitation sera maintenue jusqu'à la stabilisation des réponses des électrodes qui survient généralement au bout d'une heure. Une fois que le pH et le potentiel sont notés, la solution est prélevée et pesée comme précédemment. Cette étape constitue la borne supérieure pour le calcul de la pente de l'électrode de calcium, la borne inférieure étant constituée par les valeurs lues par les électrodes à la fin de la phase de stabilisation, au même pH.

Le calcul de la pente expérimentale de l'électrode de calcium donne toujours des valeurs légèrement inférieures à la pente théorique de 30,75. L'exploitation est en fait réalisée en utilisant une pente moyenne calculée pour une série de 10 expériences. Nous avons retenu pour l'exploitation de toutes nos expériences une pente moyenne de 30,22.

La figure III-4 montre la distribution des points expérimentaux autour de la droite qui a permis de définir la pente moyenne.

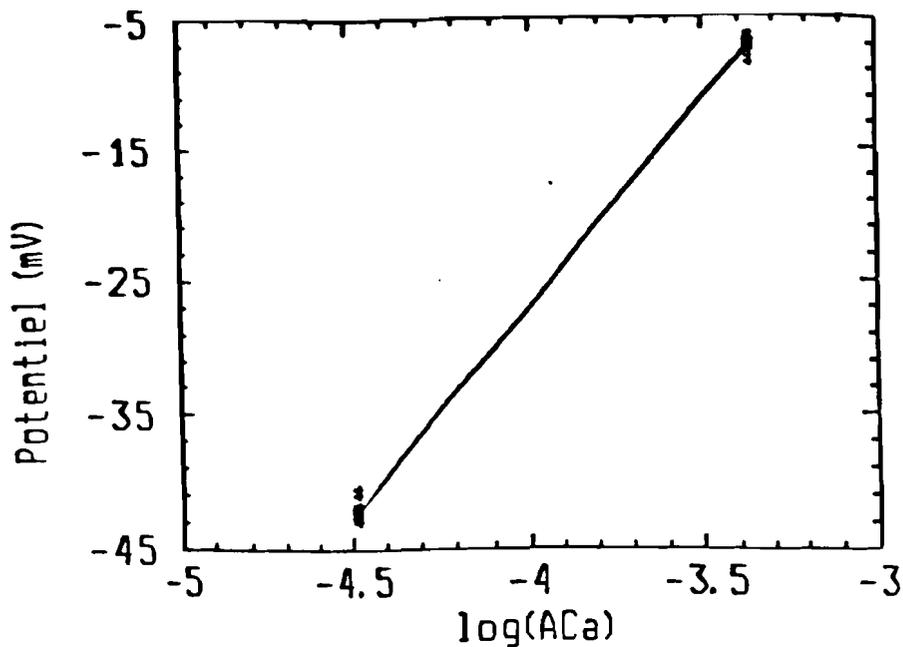


Figure III-4: Pente moyenne de l'électrode de calcium

III-2.B.5. Evaporation

La réalisation d'expériences qui durent entre 8 et 12 heures à 37°C engendre une évaporation non négligeable, malgré l'emploi d'un réacteur dont l'étanchéité a été optimisée. Nous tenons compte de cette évaporation dans l'exploitation des données. Pour caractériser cette évaporation, une série de mesures a été faite, et a permis d'établir une relation linéaire entre le volume évaporé et le temps. La loi d'évaporation est donnée par la relation suivante:

$$e = kt \quad [38]$$

avec e = volume évaporé en litres (l)

t = temps expérimental en secondes (sec.) [du début de la stabilisation à la fin de la période de dissolution]; [temps pour borne supérieure]

K = constante d'évaporation en litres par seconde ($l \times sec.^{-1}$)

La constante k est caractéristique du montage. Sa valeur reste pratiquement la même pour toutes les mesures effectuées. Elle est de l'ordre $1,0872 \times 10^{-7} l/sec. \pm 2 \times 10^{-8}$.

La figure III-5 montre l'évolution du volume de solution évaporé en fonction des temps expérimentaux.

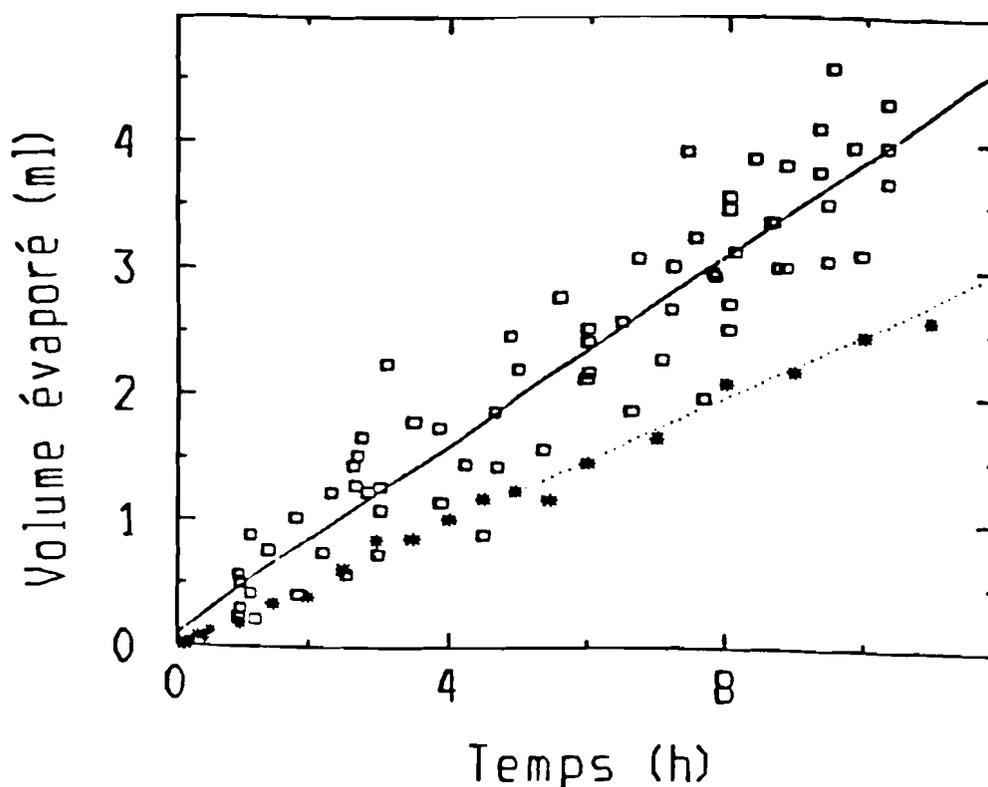


Figure III-5: Evaporation en fonction de la durée expérimentale, dans les conditions normales(=) et en étanchéité optimale (+).

Le volume évaporé est calculé à partir des pesées faites à la fin de la phase de dissolution. Ainsi, le volume de liquide dans le réacteur est calculé grâce à la relation:

$$V_f = [(S_p - T_s)/\rho] + V_r \quad [39]$$

avec V_f = volume de solution à la fin de l'expérience (ml)

S_p = masse des seringues pleines (g)

T_s = tare des seringues (g)

ρ = masse volumique de l'eau à 37°C (0,99336 g x cm⁻³)

V_r = volume résiduel de solution sur les instruments (0,16ml)

Connaissant le volume total des solutions dans le réacteur et le volume final, il est facile de calculer le volume évaporé et par conséquent la constante k.

III-2.C Exploitation des données

Les valeurs expérimentales importantes dans l'analyse des cinétiques de dissolution de l'hydroxyapatite sont celles qui sont directement accessibles par les électrodes. Ces valeurs sont d'une part les protons consommés (H^+) et d'autre part le calcium libéré (Ca^{2+}_L). D'autres données comme les phosphates libérés se déduisent par calcul. Le programme d'exploitation ne différencie pas les protons nécessaires pour le saut de pH de ceux réellement consommés par l'apatite lors de la dissolution; il ne sépare pas non plus le calcium libéré par la surface de l'apatite à la fin de la mise en équilibre de celui provenant de la dissolution. Une estimation de ces contributions est nécessaire pour l'exploitation des données.

III-2.C.1. Volume d'acide nécessaire pour le saut de pH

Le saut de pH correspond à un déplacement des équilibres dans le milieu réactionnel par apport de protons. Il s'agit en particulier des équilibres des phosphates et la protonation du polymère. En absence d'apatite, ces volumes peuvent être aisément évalués, connaissant les concentrations de phosphates et de polymère. Dans le cadre de ces expériences, le saut de pH se fait de $7 \pm 0,03$ à 5.

En ce qui concerne les polymères, il est assez difficile de calculer par des relations simples la quantité d'acide nécessaire à leur protonation. Cette difficulté est liée au fait que nous ne connaissons pas exactement le degré de protonation, autrement dit la densité de charge linéaire de ces macromolécules à la fin de la phase de mise à l'équilibre, période pendant laquelle elles s'adsorbent sur l'apatite. Néanmoins, les protons consommés par les polymères ont été quantifiés par une série de simulations de saut de pH en absence d'apatite et de phosphate (après stabilisation du pH à la valeur de mise à l'équilibre pH 7), mais en présence des mêmes quantités de polymères. Cette simulation se fait en injectant assez rapidement l'acide dans le réacteur en notant le volume injecté et le pH. Le volume d'acide nécessaire à la protonation du polymère est désigné (V_{pp}), exprimé en millilitres. La quantité de protons correspondante se calcule facilement car nous connaissons la concentration de l'acide utilisé. Les valeurs moyennes obtenues pour ces simulations en présence 0,005g% des polymères utilisés sont données (tableau III-4).

	PEI 500	PEIMe	PEIG3	PEIG7	PEI.AGPC	PEI.KEY	PEI.MOR	PEI.CHER
V_{PP}	0,045	0,286	0,290	0,290	0,534	0,565	0,365	0,379
Ref	0,07868 ± 0,00015							

Tableau III-4: Volume d'acide ($HCl\ 3 \times 10^{-2}M$) (en ml) nécessaire à la protonation des polymères lors du passage du pH de 7 à 5; concentration en polymère ici est de 0,005g%. Comparaison à la valeur moyenne pour les références (Ref).

Dans des expériences au cours desquelles nous utilisons des concentrations de 0,01g% et 0,05g% de polymères quaternisés avec le précédent acide, V_{PP} prend les valeurs moyennes suivantes: tableau III-5.

	V_{PP}	Concentration
PEI.CHER	0,735	0,01g%
	3,319	0,05g%
PEI.MOR	0,713	0,01g%

Tableau III-5: Evolution du volume d'acide pour le saut de pH avec la concentration en polymère.

Le volume d'acide pour le saut de pH (V_{spH}) obtenu lors des expériences avec les polymères comprend celui nécessaire au déplacement des équilibres des phosphates (référence) et celui indispensable à la protonation des polymères (V_{PP}). Les valeurs de V_{PP} ci-dessus sont valables pour les polymères couplés aux F^- , Cl^- ou Br^- .

Les protons nécessaires au déplacement de l'équilibre des phosphates sont en rapport avec la différence de charges entre les phosphates en fin d'équilibre et au début de la dissolution. Soit D_q cette différence de charges; le volume d'acide utilisable pour le déplacement de l'équilibre est donné par la relation suivante:

$$V_{HP} = (QP_{fe} \times D_q) / N \quad [40]$$

avec QP_{fe} = quantité de phosphates à la fin de l'équilibre.

N = normalité de l'acide.

Si V_{spH} désigne le volume d'acide total pour le saut de pH, alors:

$$V_{spH} = V_{PP} + V_{HP} \quad [41]$$

D'un point de vue pratique, c'est V_{spH} qui est expérimentalement observé. Cette valeur correspond à l'addition des volumes calculés pour le déplacement de l'équilibre

des phosphates et ceux du titrage des polymères (somme des valeurs du tableau III-4 selon le polymère utilisé).

III-1.C₂ Consommation de protons

Pendant la durée de la dissolution, un volume d'acide V_A est injecté en continu dans le réacteur. La quantité de protons consommés tout au long de cette dissolution, rapportée à la masse d'apatite est donnée par la relation suivante:

$$QH_C = N[V_A - (V_{spH} + e)] \times m^{-1} \quad [42]$$

avec m = masse d'hydroxyapatite mise à dissoudre (0,01g).

e = évaporation (l/sec.)

Les protons consommés peuvent être déterminés à tout moment de la dissolution, de façon à estimer le degré d'avancement du processus.

III-1.C3. Libération de calcium

Chacune des phases expérimentales précédemment décrites se caractérise par une activité des ions calcium en solution, traduite par un potentiel E_x . Soient E_0 et E_1 les potentiels respectifs à la fin des phases de stabilisation et de mise à l'équilibre, puis E_t le potentiel lu à un instant t quelconque de la phase de dissolution. Ces potentiels sont proportionnels au logarithme décimal de l'activité du calcium dans le vase; le facteur de proportionnalité étant la pente de l'électrode spécifique de calcium.

L'activité du calcium à la fin de la phase de mise à l'équilibre est donnée par la relation suivante:

$$(Ca_1) = (Ca_0) \times 10^{(E_1 - E_0)/P} \quad [43]$$

avec (Ca_0) = activité du calcium à la fin de la stabilisation

(Ca_1) = activité du calcium à la fin de la mise à l'équilibre

P = pente de l'électrode de calcium

E_1 = potentiel fin équilibre

E_0 = potentiel fin stabilisation.

De la même manière, l'activité du calcium dans le réacteur à l'instant t de la dissolution correspond à:

$$(Ca_t) = (Ca_1) \times 10^{(E_t - E_1)/P} \quad [44]$$

où E_t est le potentiel à l'instant t.

Pour chacune de ces phases, on calcule facilement le facteur d'activité grâce à la loi de Debye-Hückel ([34]), ce qui permet d'obtenir les concentrations de calcium à chaque phase du processus.

La concentration du calcium dans le réacteur à l'instant t représente en fait le calcium présent dans le réacteur à la fin de la mise à l'équilibre augmenté de celui libéré pendant la dissolution. Le calcium libéré à un instant t de la dissolution est tout simplement la différence entre le calcium total et celui de la fin de la phase de mise à l'équilibre. Ce calcium est exprimé par rapport à la masse d'apatite mise en dissolution selon la relation:

$$QCa_L = ([Ca_t]V_t - [Ca_1]V_1) \times m^{-1}. \quad [45]$$

avec: $[Ca_t]$ = concentration du calcium dans le réacteur au temps t

V_t = volume de solution dans le réacteur au temps t

$[Ca_1]$ = concentration du calcium à la fin de l'équilibre

V_1 = volume fin équilibre + V_{spH}

Le volume de solution dans le réacteur tient compte de l'évaporation.

En assumant une dissolution conforme de l'hydroxyapatite il est possible d'estimer en parallèle les phosphates en solution en se basant soit sur le calcium libéré ou sur les protons consommés.

III-2.C4. Fluorures en solution

De la même manière que pour le calcium, il est possible d'estimer la concentration des F^- en solution, connaissant la pente (P) de l'électrode, le potentiel dans le réacteur à un temps t (mV_F) et la valeur à zéro (mV_0) obtenue par régression linéaire sur les potentiels notés pendant la mise à l'équilibre. Exprimée en ppm, la concentration des F^- en solution est donnée par la relation suivante:

$$[F^-] = 10^{(mV_F - mV_0)/P} \quad [46]$$

CHAPITRE IV

EFFETS INTRINSEQUES DES POLYMERES SUR LE PROCESSUS DE DISSOLUTION DE L'HYDROXYAPATITE

IV-1. CINETIQUES DE REFERENCE à pH 5

- IV-1.A. Consommation des protons et libération de calcium
- IV-1.B. Le rapport de congruence
- IV-1.C. Quantification de l'inhibition
- IV-1.D. Conclusion

IV-2. EFFETS INTRINSEQUES DES POLYMERES SUR LA DISSOLUTION

IV-2.A. INFLUENCE DES POLYMERES SUR LA MISE A L'EQUILIBRE

- IV-2.A.1. Détermination de $[P]_{fe}$
- IV-2.A.2. Conclusion

IV-2.B. LES PEI LINEAIRES: EFFET DE LA MASSE MOLECULAIRE

- IV-2.B.1. Consommation des protons et libération de calcium
- IV-2.B.2. Le rapport de congruence
- IV-2.B.3. Quantification de l'inhibition
- IV-2.B.4. Conclusion

IV-2.C. EFFETS DE L'ALKYLATION DES PEI

- IV-2.C.1. Consommation des protons et libération du calcium
- IV-2.C.2. Le rapport de congruence
- IV-2.C.3. Quantification de l'inhibition

IV-2.D. EFFETS DE LA FONCTIONNALISATION DES PEI.

- IV-2.D.1. Effets de la carboxylation de PEI.me
- IV-2.D.2. Effets de la phosphorylation de PEI.Me
- IV-2.D.3. Comparaison des effets de la fonctionnalisation

IV-2.E. EFFETS DES POLYMERES DE STRUCTURE HETEROGENE

IV-2.E.1. Effets de l'association carboxyle-alkyle

- IV-2.E.1a. Consommation des protons et libération du calcium
- IV-2.E.1b. Rapport de congruence
- IV-2.E.1c. Quantification de l'inhibition
- IV-2.E.1d. Conclusion

IV-2.E.2. Effets de l'association phosphonate-alkyle

- IV-2.E.2a. Consommation des protons et libération de calcium
- IV-2.E.2b. Rapport de congruence
- IV-2.E.2c. Quantification de l'inhibition
- IV-2.E.2d. Conclusion

IV-2.3. Comparaison des effets de PEI.MOR 1 et PEI.CHER 1

IV-2.4. Influence de la concentration de PEI.CHER 1....

IV-2.F. DISCUSSION

IV-2.G. CONCLUSION

Le développement d'une lésion carieuse est un phénomène évolutif qui, non maîtrisé, aboutit à la destruction de la dent. Pour faire face à une telle pathologie, il est indispensable de comprendre les mécanismes qui gouvernent sa progression. Cette compréhension, grâce à la modélisation, permet de mettre au point des approches originales pour aborder certains aspects prophylactiques liés à cette pathologie. C'est à partir d'une telle démarche que les polymères qui vont être étudiés pour leur capacité à interférer avec la dissolution de l'hydroxyapatite ont été conçus et synthétisés (voir Chap.II). Ces capacités dépendent entre autre des interactions qui peuvent se développer entre la surface de l'apatite et les polymères. L'adsorption des polymères sur les apatites est en relation avec les propriétés électrochimiques de leur surface, elles-mêmes conditionnées par le pH, les concentrations en calcium, phosphate et les autres ions susceptibles d'interférer avec l'établissement d'un potentiel électrique interfacial (*Sumasundaran et coll.*, 1984). Comme nous l'avons montré dans le modèle de dissolution, la charge interfaciale est un paramètre important pour la caractérisation d'un solide dans la mesure où elle détermine la façon par laquelle un processus d'adsorption ou d'adhérence peut survenir. L'adsorption irréversible des polymères sur la surface de l'hydroxyapatite peut ainsi avoir une incidence sur le transport des ions issus de la dégradation du solide en milieu acide, en association avec les charges électriques préexistantes à l'interface. Nous allons dans ce chapitre essayer de tirer bénéfice de cet ensemble de données pour évaluer l'effet des polymères synthétisés et vérifier si les résultats escomptés sont atteints.

Dans la suite de cette analyse, nous entendons par inhibition toute limitation ou ralentissement du processus étudié, par rapport à son évolution normale. Dans nos expériences, les valeurs expérimentales auxquelles nous avons accès sont les protons consommés et le calcium libéré, en fonction du temps. Pour un inhibiteur potentiel, l'action est évaluée par rapport à une expérience de référence. La cinétique de référence est donc une expérience de dissolution faite en présence de la seule hydroxyapatite, mais dans des conditions expérimentales identiques (voir chap. III).

La dissolution est dite congruente lorsqu'elle se réalise conformément à la dissociation d'une maille d'hydroxyapatite libérant 10 cations calcium et 6 anions phosphates pour n protons consommés, selon la relation [1] (chap I). ($n = 14$ pour pH 5).

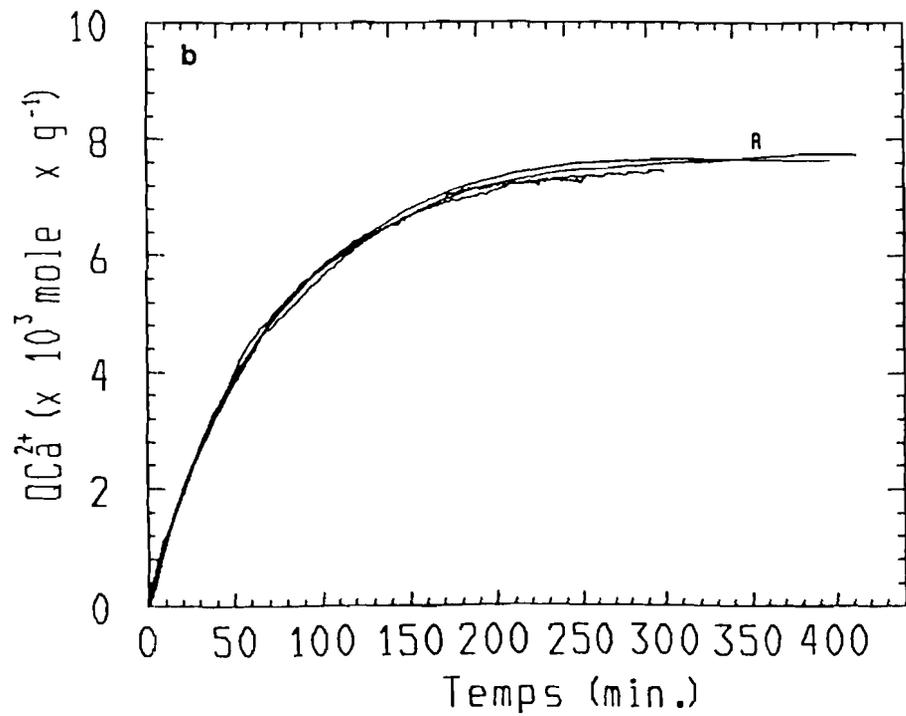
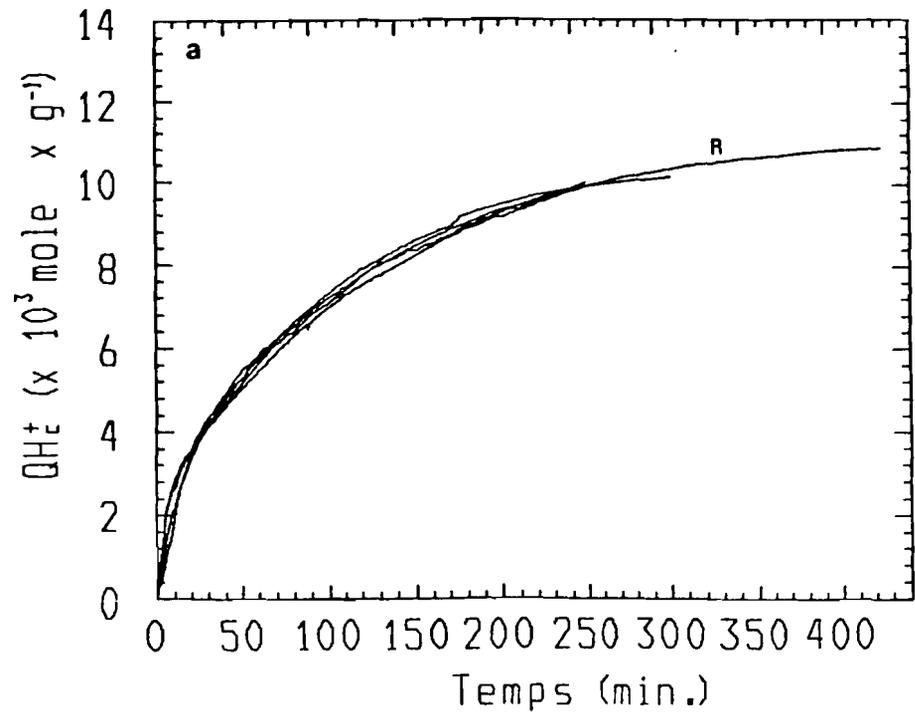


Figure IV-1 (a,b): Cinétiques de consommation des protons (a) et de libération du calcium (b) pour les expériences de référence: 10mg HAS; pH 5; 1000rpm.

IV-1. CINETIQUES DE REFERENCE à pH 5

Des études antérieures (*Gramain et coll. 1987 ; Thomann 1989*) ont montré que la dissolution de l'hydroxyapatite est un processus auto-inhibé par la formation d'une couche adhérente chargée peu soluble, à partir des produits de dégradation de la surface. Cette couche se forme par adsorption des ions Ca^{2+} à la surface des cristaux d'apatite et se comporte alors comme une membrane à perméabilité sélective échangeuse d'ions. La présence d'une telle membrane explique pourquoi, en absence de tout inhibiteur potentiel, la vitesse de dissolution de l'apatite est bien plus faible que celle attendue pour un processus contrôlé par la pure diffusion à travers la couche de Nernst.

Les expériences de dissolution de HAS (dites de référence) sont réalisées selon le protocole expérimental décrit au chapitre III. Pour rappel, les manipulations sont faites dans 50ml de solution "D" contenant $3,85 \times 10^{-5} \text{M}$ CaCl_2 , $5 \times 10^{-5} \text{M}$ KH_2PO_4 , $1,12 \times 10^{-3} \text{M}$ KCl . Après une phase de stabilisation des électrodes à pH 5 pendant au moins 1 heure, par addition de gouttes de KOH, le pH est passé à la valeur choisie pour la mise à l'équilibre (pH 7). Lorsque les électrodes donnent une lecture du pH et du potentiel du calcium stable, 10mg de poudre d'apatite de synthèse sont ajoutés dans le réacteur. Après environ 2 heures et lorsque le pH est stabilisé ainsi que le potentiel lu pour le calcium, la mise à l'équilibre est considérée comme atteinte et la dissolution proprement dite débute par une injection rapide de HCl $3 \times 10^{-2} \text{M}$ dans le réacteur pour faire passer le pH fin équilibre pH ($7 \pm 0,03$) au pH de dissolution (pH 5). Les cinétiques de consommation des protons et de libération du calcium seront suivies en continu jusqu'à terme de l'expérience.

IV.1-A. Consommation des protons et libération de calcium

L'analyse des cinétiques (figures IV-1 a,b) permet de voir dans un premier temps une bonne reproductibilité des expériences. Pour dissoudre totalement 10mg (0,01g) de HAS, il faut $1,3935 \times 10^{-2}$ moles de protons par gramme et par conséquent une libération de $9,954 \times 10^{-3}$ moles de calcium, dans l'hypothèse d'une dissolution congruente.

Après 7 heures de dissolution, la moyenne de consommation de protons est de $1,0896 \times 10^{-2}$ moles $\times \text{g}^{-1}_{\text{HAS}}$ alors que celle de la libération de calcium est de $7,752 \times 10^{-3}$ moles $\times \text{g}^{-1}_{\text{HAS}}$. Par comparaison aux valeurs correspondant à la dissolution totale, nous pouvons estimer le taux de dissolution au terme de cette durée expérimentale à environ 80% de dissolution totale.

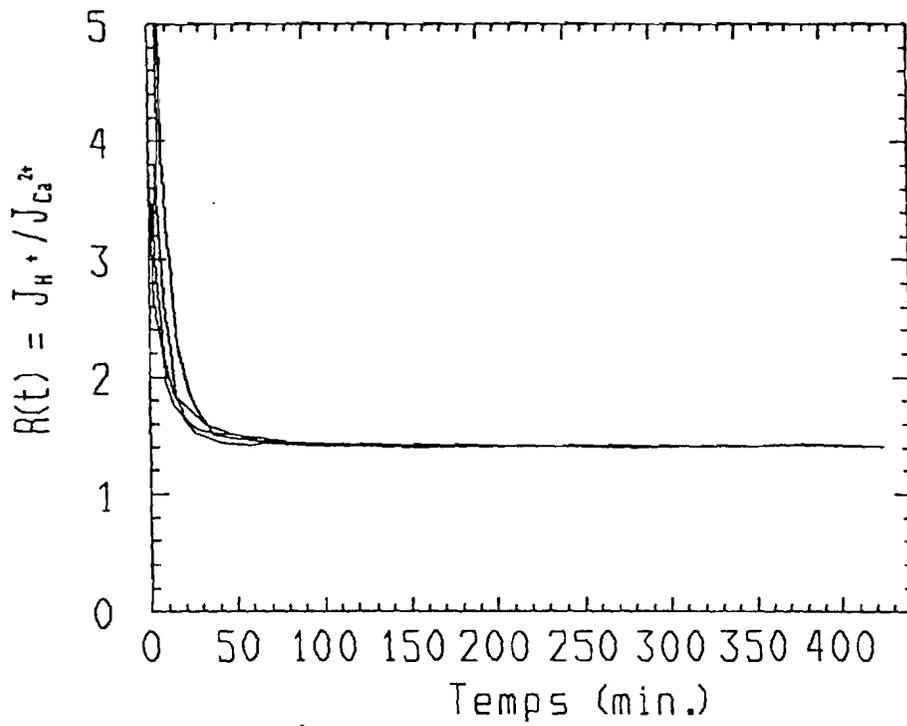


Figure IV-2: Evolution en fonction du temps du rapport de congruence pour les expériences de référence.

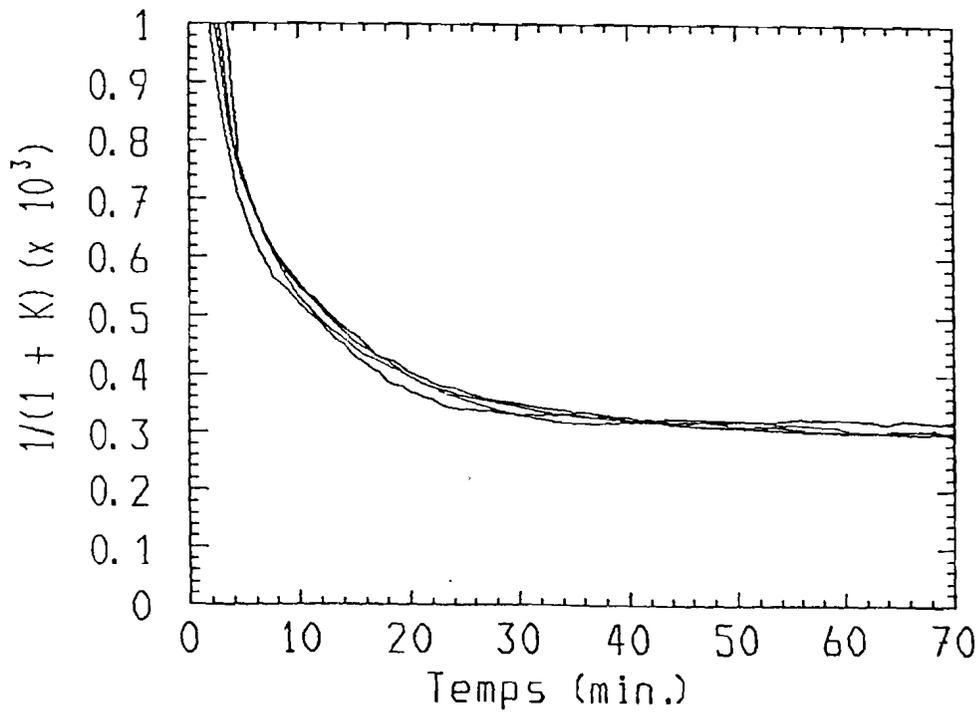


Figure IV-3: Evolution du facteur caractéristique de l'inhibition, en fonction du temps, pour les cinétiques de référence.

Les cinétiques se caractérisent par une réduction progressive des vitesses qui, à la fin de l'expérience, sont si faibles que le processus de dissolution semble s'arrêter. Cette forte réduction des vitesses est due au fait que l'on se rapproche de la saturation.

IV-1.B. Le rapport de congruence

La processus de dissolution de l'hydroxyapatite se caractérise d'abord par un rapport de congruence $R(t)$ (figure IV-2) aux instants initiaux prenant des valeurs supérieures à sa valeur théorique (1,4).

Les fortes valeurs initiales de $R(t)$ traduisent une accumulation du calcium à l'interface. C'est notamment à partir d'un tel résultat que le modèle de dissolution précédemment présenté a pu être élaboré. Cette observation confirme la stabilité des résultats expérimentaux et la validité du modèle qui sont retrouvés intégralement bien qu'espacés de nombreuses années.

IV-1.C. Quantification de l'auto-inhibition

La limitation de la dissolution par les produits de dégradation peut être mieux visualisée en suivant l'évolution de $1/(1+K)$ en fonction du temps. K^{-1} caractérise la réduction de la perméabilité de la membrane chargée en comparaison avec la perméabilité à travers la couche de Nernst (figure.IV-3).

La transformation de la relation [30] (chap. I) permet d'écrire:

$$\frac{1}{1+K} = - \frac{J_H^+(t)}{RP_{Ca}^0(a_s - a(t))}$$

Cette relation est applicable pour une dissolution congruente, ce qui est bien le cas pour les cinétiques de référence.

L'évolution du rapport $1/(1+K)$ traduit la formation de la membrane inhibitrice et la diminution de sa perméabilité. Cette évolution au cours du temps montre bien qu'au fur et à mesure que les produits de dégradation s'accumulent à l'interface avec notamment l'adsorption des ions Ca^{2+} , l'inhibition s'accentue.

A la fin de l'expérience la plus longue (440 minutes) l'activité du calcium en fonction du temps en solution est $a(t) = 1,225 \times 10^{-3} M$, alors que l'activité théorique (dissolution congruente par rapport au calcium et au phosphate) pour la saturation est de $1,569 \times 10^{-3} M$. La faible différence entre ces deux valeurs indique bien, en tenant

compte des erreurs expérimentales, que l'on se trouve proche de l'équilibre thermodynamique.

En considérant l'allure de la cinétique de consommation des protons, il semble difficile de pouvoir atteindre le a_s théorique dans des périodes expérimentales raisonnables. L'arrêt complet de la cinétique est de ce fait un processus long. Nous avons dans ces conditions considéré la valeur théorique $a_s=1,569 \times 10^{-3} \text{M}$ pour la détermination de K.

Lorsque le processus de dégradation de l'apatite atteint le taux de 30% (après environ 30 minutes), K prend une valeur de l'ordre de $2,940 \times 10^3$, comparable à celle déterminée par *Thomann et coll.* (1991) (de l'ordre de 2×10^3) dans une solution de dissolution plus saturée en calcium et en présence de $8 \times 10^{-2} \text{M}$ KCl. Cette évolution du facteur caractéristique de l'inhibition au cours du temps traduit, conformément au modèle la mise en place progressive d'une structure interfaciale qui ralentit la diffusion des ions provenant de la dissolution.

Compte tenu des variations de la surface de l'hydroxyapatite au cours de la dissolution, l'analyse quantitative du rapport $1/(1+K)$ ne peut être poursuivie au delà d'un taux de conversion de 30%, valeur en deçà de laquelle ces variations restent négligeables à cause de la forme plaquettaire de l'apatite utilisée.

IV-1.D. Conclusion

La dissolution de l'hydroxyapatite en milieu acide conduit à la formation d'une membrane inorganique chargée à partir des produits de dégradation qui s'adsorbent à la surface des cristaux. L'adsorption des ions calcium fait de cette membrane une structure chargée positivement et servant de barrière de diffusion. La diminution de la perméabilité de cette membrane pour les produits de dégradation est décrite par le rapport $1/(1+K)$. Cette membrane est de ce fait une structure inhibitrice de la dissolution. Comme les éléments qui la constituent proviennent de la dissolution de l'hydroxyapatite, nous pouvons dire que le processus de dissolution est auto-inhibé.

IV-2. EFFETS INTRINSEQUES DES POLYMERES SUR LA DISSOLUTION

Dans les paragraphes qui vont suivre, les capacités inhibitrices des polymères dont la synthèse a été précédemment présentée (chapitre II) vont être évaluées, en prenant comme base de comparaison les résultats de l'auto-inhibition.

Sur cette base, un polymère sera considéré comme agent inhibiteur lorsque les quantités de protons consommés et de calcium libéré en sa présence, à un temps donné, sont inférieures à celles de la cinétique de référence. Le taux de dissolution sera exprimé par rapport à la dissolution totale, en supposant que celle-ci puisse être expérimentalement atteinte. L'effet observé englobera donc l'auto-inhibition et l'inhibition due au polymère; cette dernière pourra être déduite par différence.

L'action des polymères sera évaluée par l'étude de leurs effets intrinsèques, en considérant les masses moléculaires ainsi que les transformations structurales. L'apport de chaque modification sur l'inhibition du processus de dissolution sera évalué par rapport à la cinétique de référence et par rapport au polymère le moins modifié, mais de structure proche.

Dans le cadre de ce travail, nous qualifions d'intrinsèques les effets qui sont attribuables aux seules capacités du polymère, lorsque celui-ci est couplé à un contre-ion qui est sans action actuellement connue sur le processus de dissolution des apatites. Les effets décrits dépendent des propriétés physico-chimiques du polymère, conditionnant les interactions développées avec la surface apatitique. L'étude de ces effets intrinsèques est primordiale dans la mesure où elle oriente le choix des molécules qui seront retenues pour une analyse plus poussée. La présélection a été faite par des essais de dissolution pour une concentration unique de 0,005g% (masse/volume). Les méthodes de préparation des solutions de ces polymères ont été présentées au chapitre III.

Les expériences d'inhibition ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que les cinétiques de référence. Toutes les cinétiques sont donc obtenues à pH 5, dans la solution "D"(voir chapitre III).

Avant d'étudier les effets des polymères sur la dissolution, il est intéressant d'analyser leur influence sur la phase de mise à l'équilibre

IV-2.A. INFLUENCE DES POLYMERES SUR LA MISE A L'EQUILIBRE

L'addition de la solution de polymère dans le réacteur pendant la phase de mise à l'équilibre (voir chap. III) modifie l'évolution des ions en solution pour conduire à un rééquilibrage permettant de respecter le produit de solubilité de l'hydroxyapatite.

Pour les expériences réalisées avec les polymères renfermant des amines secondaires et tertiaires, les moyennes des variations de pH et dans chaque classe sont données dans le tableau IV-1. La deuxième partie présente les variations du pH lors de l'ajout des polymères fonctionnalisés.

Les données de la première partie de ce tableau montrent qu'il y a une déprotonation plus importante des PEI secondaires par rapport aux tertiaires. Les écarts entre les protons libérés par les polymères linéaires et les alkylés sont d'un ordre de grandeur 10.

Pour les polymères fonctionnalisés et quaternisés, on note une faible chute du pH de l'ordre de 0,3 unité, suivie d'une légère remontée et stabilisation aux environs de pH 7,5. Ces variations sont dues à l'effet de dilution qui accompagne le mélange des solutions puis une captation des protons libres en solution par les amines secondaires des polymères.

Polymères	Conc. g%(m/v)	pH _i	pH _m	H ⁺ _L x10 ³ moles	pH _f	temps (min)
PEI500HCl	0,005	6,97	2,57	13,5	7,21	65
PEIMeHCl	0,005	7,24	3,84	0,72	6,98	65
PEIG ₃ HCl	0,005	9,20	3,78	0,83	7,13	65
PEIG ₇ HCl	0,005	8,70	3,98	0,52	7,20	55
PELAGPC1	0,005	7,20	7,00	0,0002	7,45	35
PELKEV1	0,005	6,98	6,75	0,0036	7,40	55
PELMOR1	0,005	6,89	6,74	0,0026	7,47	45
PELCHER1	0,005	7,09	6,87	0,0027	7,45	55

Tableau IV-1: Variations du pH par déprotonation instantanée ou par effet de dilution dans le réacteur lors de l'ajout du polymère. Les concentrations sont exprimées en g%(m/v). pH_i = pH dans le réacteur avant ajout du polymère; pH_m = pH le plus bas atteint en présence du polymère. H⁺_L indique la quantité (en moles) de protons libérés par le polymère (calculée à partir de la différence des pH, pour un volume de 50ml). pH_f est le pH final atteint après rajout de KOH; le temps moyen pour la stabilisation du pH à la valeur pH_f est exprimé en minutes.

L'addition de la poudre d'apatite dans le réacteur s'accompagne, dans les expériences de référence d'une libération du calcium et du phosphate de surface, adsorbés au moment de la préparation de la poudre (*Gramain et coll.,1987*). En présence d'une solution de polymère, le calcium en solution diminue, comparativement à une référence. Ces réactions sont des échanges ioniques entre la solution et la surface

permettant de respecter le produit de solubilité de l'apatite. Les principales modifications observées sont résumées dans le tableau IV-2.

	[C°] x10 ³ g%	[Ca] _i x10 ⁵ M	[P] _i x10 ⁵ M	[Ca] _{fe} x10 ⁵ M	[P] _{fe} x10 ⁵ M	pH _{fe}
Ref		3,85	5	5,12	6,29	7,08
PEI500HCl	5	3,85	5	4,95	6,56	7,05
PEI5eHCl	5	3,85	5	3,85	6,83	7,11
PEIG3HCl	5	3,85	5	4,65	6,89	7,03
PEIG7HCl	5	3,85	5	4,05	7,96	6,98
PELAGPC1	5	3,85	5	4,51	6,90	7,04
PEI.KEV1	5	3,85	5	2,95	8,38	7,07
PEI.MOR1	5	3,85	5	4,43	6,79	7,06
PEI.CHER1	5	3,85	5	2,75	9,74	7,02

Tableau IV-2: Variations des concentrations ioniques dans le réacteur en présence des solutions de polymères concentrées à 0,005g%, et de 10mg de HAS, comparées à une référence. [Ca]_i est la concentration en calcium de la solution "D". [Ca]_{fe} = concentration de calcium dans le réacteur à la fin de la mise à l'équilibre, donnée par l'électrode. [P]_i = concentration en phosphate de la solution "D". [P]_{fe} = concentration de phosphate dans le réacteur à la fin de la mise à l'équilibre, estimée par rapport au produit de solubilité de l'apatite. pH_{fe} = pH à la fin de la mise à l'équilibre.

IV-2.A.1 Détermination de [P]_{fe}

Dans la solution "D" il a été initialement rajouté une concentration de phosphate de $5 \times 10^{-5} \text{M}$. Il est expérimentalement difficile de suivre en continu son évolution avec le temps, mais on peut estimer la concentration du phosphate en solution par le biais du produit de solubilité de l'hydroxyapatite. On suppose dans ce cas une saturation par rapport à l'hydroxyapatite ($K_{sp} = 1,189 \times 10^{-60}$). [P]_{fe} est calculée en considérant [Ca]_{fe} et le pH. Il est à noter que cette approche conduit à une libération de phosphate lors du processus d'adsorption des polymères.

Pour les polymères comportant des groupements phosphates, il est difficile de prédire leur influence sur la mise à l'équilibre. Il faudrait par exemple connaître le nombre de groupements adsorbés et déterminer par différence ceux qui participent à l'équilibre.

Dans nos conditions expérimentales, une telle évaluation est difficile. Cependant, par rapport au phosphate en solution, la concentration en phosphate associé aux polymères est beaucoup plus élevée (environ $2 \times 10^{-4} \text{M}$, calculée à partir des données de l'analyse élémentaire et la concentration expérimentale du polymère). Ceci permet de penser que dans une proportion que nous ignorons, une partie de ces phosphates associés aux polymères intervient dans le processus de mise à l'équilibre.

Le tableau IV-1 montre que pendant cette phase, les polymères en s'adsorbant influencent significativement les échanges ioniques. Pour respecter le produit de solubilité de l'apatite, la diminution du calcium en solution est compensée par une libération équivalente de phosphate. Cette libération du phosphate pendant le processus d'adsorption de polymères sur l'apatite avait déjà été notée par *Roseman et coll.*, (1969); *Bartels et Arends* (1979) ainsi que *Pearce et coll.*, (1980).

En ne considérant que les polymères de structure hétérogène, une augmentation de la concentration donne les variations suivantes sur l'évolution des ions en solution (tableau IV-3).

	[C°] g%(m/v)	[Ca] _i x10 ⁵ M	[P] _i x10 ⁵ M	[Ca] _{fe} x10 ⁵ M	[P] _{fe} x10 ⁵ M	pH _{fe}
PEL.CHER1	0,005	3,85	5	2,75	4,74	7,02
	0,010	3,85	5	1,76	9,56	7,03
	0,050	3,85	5	0,75	33,14	7,08
PEL.MOR1	0,005	3,85	5	4,43	1,79	7,06
	0,010	3,85	5	3,35	6,09	6,89

Tableau IV-3: Effets de la concentration de polymères sur la mise à l'équilibre.

Les effets précédemment décrits s'accroissent en augmentant la concentration du polymère en solution.

Remarque: En présence des polymères, le processus de mise à l'équilibre s'accompagne de leur adsorption sur l'hydroxyapatite. Elle est facilitée lorsque le polymère est alkylé et fonctionnalisé (*Akhmedov et coll.*, 1979). L'adsorption serait d'autant plus irréversible que la surface de l'adsorbant est chargée négativement (*Blaakmer et coll.*, 1990) et que le polymère établit avec elle de nombreux contacts (*Kosmas*, 1990).

Nous n'avons pas fait une étude de l'adsorption des polymères synthétisés sur l'apatite et nous ignorons par conséquent les quantités adsorbées ainsi que l'architecture de ces polymères à l'interface. L'adsorption supposée est estimée indirectement par la mesure de l'effet sur la dissolution.

IV-2.A.2. Conclusion

Pendant la mise à l'équilibre, l'adsorption des polymères sur l'apatite retarde la libération du calcium par la surface, mais favorise celle du phosphate.

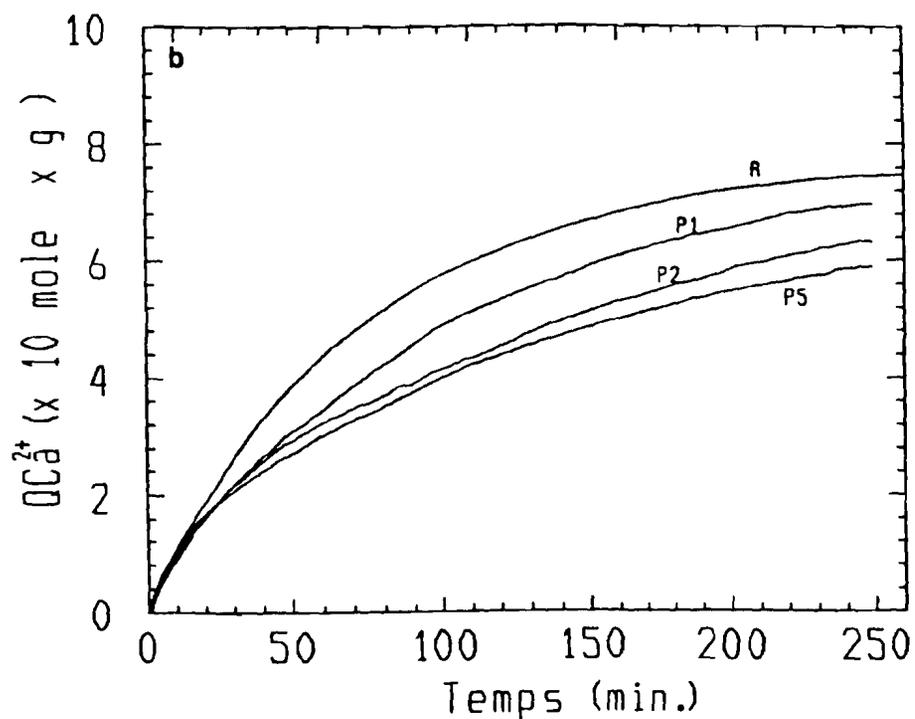
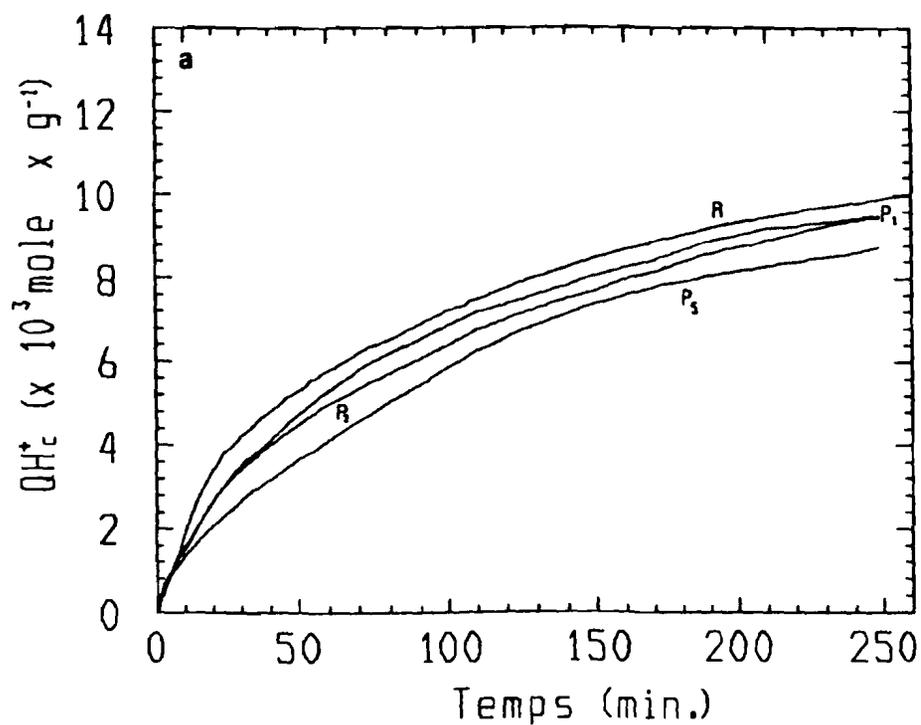


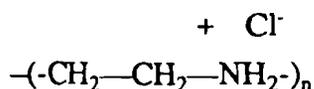
Figure IV-4 (a,b): Influence de la masse moléculaire des chlorures de PEI linéaires sur la consommation des protons (a) et la libération de calcium (b). Comparaison avec une cinétique de référence (R).

P1 = PEI 50; P2 = PEI 200; P5 = PEI 500.

Les concentrations en calcium et phosphate à la fin de la phase de mise à l'équilibre montrent bien que, malgré l'atteinte de l'équilibre thermodynamique, la composition de la solution n'est pas stoechiométrique par rapport à l'apatite. Ces effets sont amplifiés avec l'augmentation de la concentration de la solution du polymère. Dans tous les cas, le produit de solubilité de l'apatite est respecté.

IV-2.B. LES PEI LINEAIRES: EFFETS DE LA MASSE MOLECULAIRE

Les PEI linéaires sont les polymères de base qui ne se différencient que par la masse moléculaire. Ils permettent d'analyser l'importance de cette *masse moléculaire* dans le processus d'inhibition de la dissolution. Les polymères synthétisés pour cette première évaluation sont dénommés PEI 50, PEI 200 et PEI 500, ($M_w = 5 \times 10^4$, 2×10^5 et 5×10^5 , voir chap.II) couplés aux anions Cl^- . Ce sont donc des chlorures de poly(éthylèneimine). Pour rappel, leur structure chimique est la suivante:



IV-2.B.1. Consommation des protons et libération de calcium

Les figures IV-4(a, b) montrent que les PEI linéaires inhibent globalement la dissolution. L'inhibition croît avec la masse moléculaire du polymère. Les taux de conversion en présence de PEI 500, par rapport à la consommation de protons et la libération de calcium, après environ 4 heures sont respectivement de 63% et 59%, alors qu'ils sont de 69% et 65% pour PEI 50. Par comparaison, un taux de conversion de 71 % est atteint dans les mêmes conditions pour une cinétique de référence.

Les différences du taux de dissolution évalué à partir des protons consommés et du calcium libéré vont dans le sens d'une accumulation de calcium plus importante en présence de polymère.

IV-2.B.2. Le rapport de congruence

Les PEI linéaires modifient l'évolution en fonction du temps du rapport de congruence, comparativement à la référence (figure IV-5).

Malgré l'évolution assez particulière de $R(t)$ aux instants initiaux en présence des PEI de forte masse moléculaire, ce rapport se rapproche de la congruence à la fin de l'expérience. La diminution rapide de $R(t)$ aux instants initiaux correspond à une formation plus rapide de la membrane.

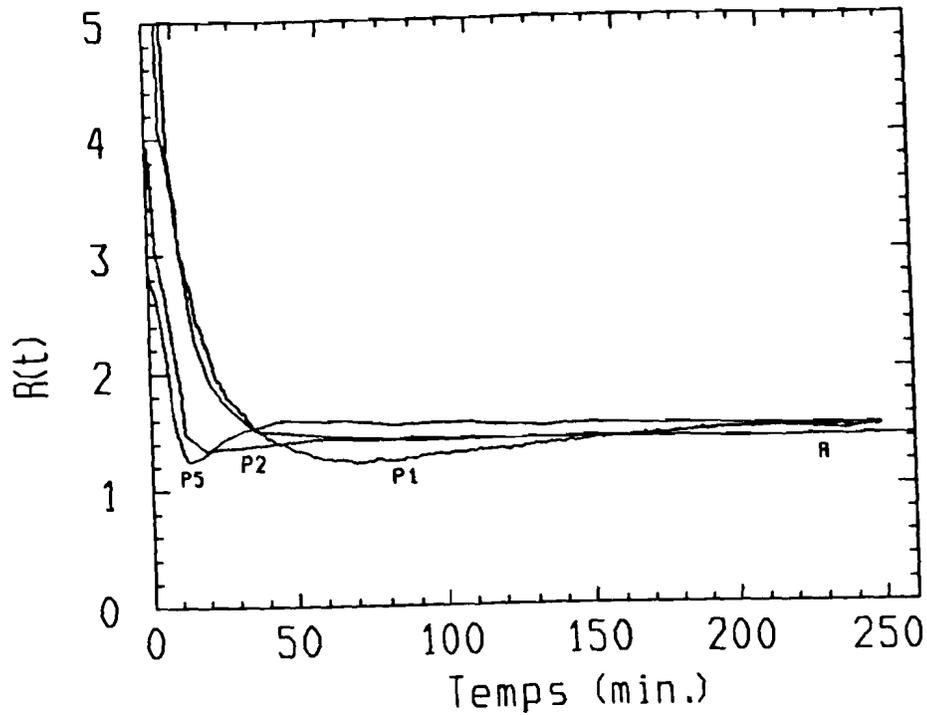


Figure IV-5: Evolution en fonction du temps, du rapport de congruence en présence de PEI 50 (P1), PEI 200 (P2) et PEI 500 (P5), comparée à une expérience de référence (R).

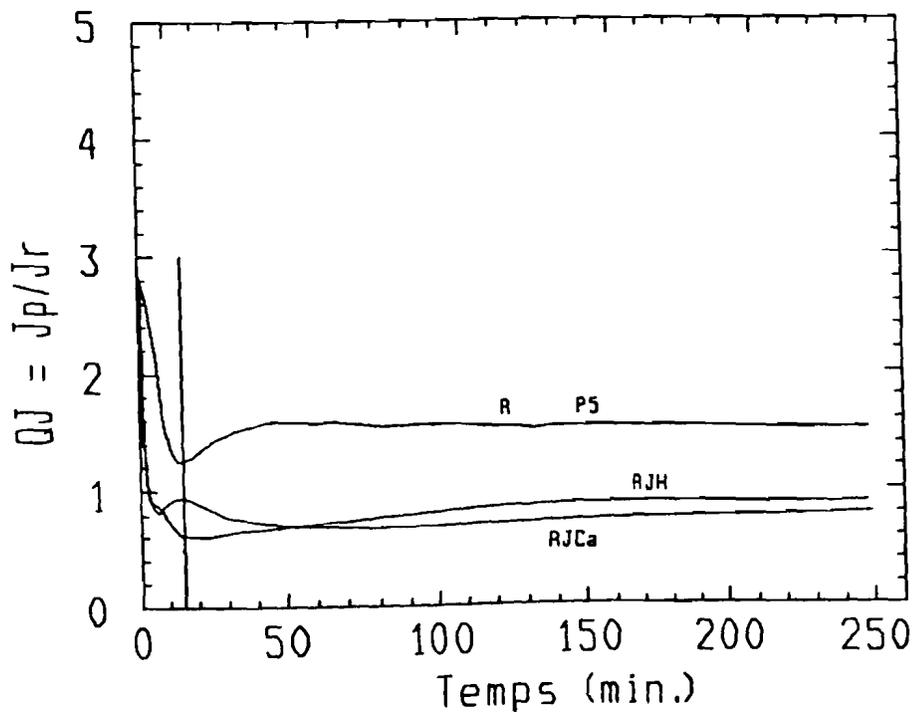


Figure IV-6: Variations en fonction du temps des flux de consommation des protons (RJH) et de libération de calcium (RJC α), comparées à l'évolution du rapport de congruence en présence de PEI 500 (P5). Le trait vertical correspond au temps où $R(t)$ est minimum, concordant avec l'allure de RJH et RJC α .

La diminution de $R(t)$ est d'autant plus rapide que la masse moléculaire est importante. Pour essayer de comprendre ce phénomène, nous avons analysé les variations de la consommation des protons et de la libération du calcium. Ces variations sont obtenues en faisant le rapport des flux de protons consommés en présence du polymère et de ceux de la référence (RJH); une démarche identique a été entreprise pour le calcium (RJCa),(Figure IV-6).

On constate une diminution initiale de RJH et RJCa; puis RJH continue de décroître alors que RJCa croît. Progressivement, le processus devient similaire pour le proton et le calcium. Le minimum de $R(t)$ correspond au temps où RJH et RJCa ont respectivement atteint leur valeur minimale et maximale. Une compétition semble exister entre la réduction de la consommation des protons et le déplacement des ions calcium de la surface pendant l'adsorption du polymère. On remarquera également que ce phénomène est d'autant plus rapide que la masse moléculaire du polymère est plus forte. Un déplacement du calcium par adsorption d'un polycation avait déjà été noté par *Shimabayashi et coll.* (1987[a, b]). Il traduit une compétition d'adsorption du calcium et du polymère à la surface de l'apatite. Cette compétition peut également être couplée à un échange ionique simple entre le calcium et le polycation, afin de conserver l'électroneutralité de la surface de l'apatite. Le déplacement de calcium par le polycation implique aussi un maintien du phosphate au niveau de l'interface (*Pearce*, 1981), malgré l'observation faite pendant la période de mise à l'équilibre selon laquelle le polymère favorise la libération de phosphate par l'apatite. Cet effet de retard de libération du phosphate par l'apatite après adsorption d'un polycation avait déjà été signalé par *Higuchi et coll.*, (1984).

La diminution de RJH semble liée à la poursuite du processus de protonation du polymère dans les instants initiaux de la dissolution. Ce résultat montre aussi que la quantité d'acide ajoutée pour le saut de pH ne suffit pas pour protoner totalement le polymère. Ainsi, seule une partie, difficile à quantifier, de l'acide injectée au cours des instants initiaux est réellement utilisée pour la dissolution.

IV-2.B.3. Quantification de l'inhibition par les PEI linéaires.

La quantification de l'inhibition se fait de la même manière que pour les cinétiques de référence. Sur la figure IV-7 sont présentées les courbes de quantification de l'inhibition par le biais du paramètre $1/(1+K)$ en fonction du temps.

Pour la détermination de K , il faut connaître la valeur de l'activité ionique du calcium pour la saturation (a_s), donnée à l'équilibre, en supposant une dissolution congruente par rapport au calcium et au phosphate. Si pour les cinétiques de référence

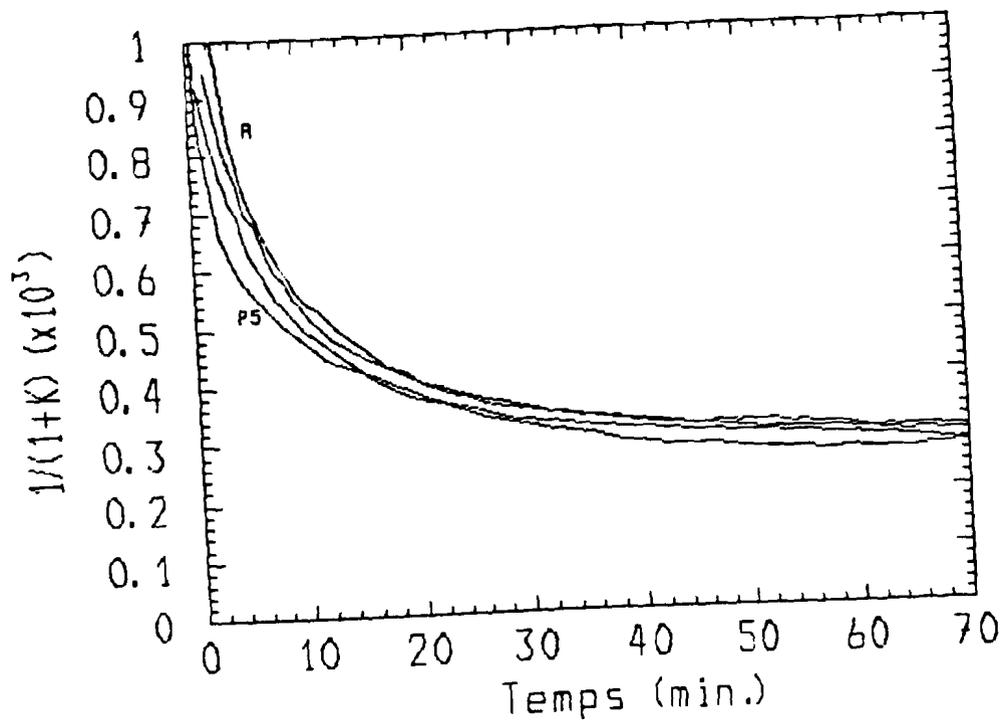


Figure IV-7: Evolution de $1/(1+K)$ en fonction du temps, en orésence de PEI linéaires; comparaison avec une courbe de référence (R).

cet équilibre est long à atteindre, il l'est encore beaucoup plus avec les polymères. N'ayant pas étudié le produit de solubilité de l'hydroxyapatite en présence des polymères, nous supposons pour la suite de l'analyse que ce produit ne change pas et que l'activité ionique du calcium pour la saturation (a_s) reste égale à la valeur calculée ($1,569 \times 10^{-3} M$). Pour l'évaluation des effets des polymères, on compare donc les cinétiques à la fin de l'expérience, sachant que l'on n'est pas totalement à l'équilibre. En considérant PEI 500, la valeur de l'activité dans le réacteur à la fin de l'expérience (250 minutes) est $9,09 \times 10^{-4} M$, alors que celle atteinte pour les cinétiques de référence est de $1,08 \times 10^{-3} M$. La différence entre ces activités déterminées après une durée de dissolution identique permet de conclure que les polymères retardent la dissolution de l'apatite. Après 30 minutes de dissolution, K est estimé à environ 3×10^3 pour PEI 500 alors que dans le même temps il est de l'ordre de $2,940 \times 10^3$ pour la référence.

IV-2.B.4. Conclusion

Nous pouvons dire de cette première analyse que, malgré le caractère modeste de leurs effets, les PEI linéaires inhibent néanmoins la dissolution de l'hydroxyapatite. Cette inhibition est d'autant plus importante que la masse moléculaire est élevée et se traduit par des activités ioniques plus faibles en solution, par comparaison à une cinétique de référence.

Tous les dérivés impliqués dans la suite de l'étude ont été synthétisés à partir du squelette de PEI 500.

IV-2.C. EFFETS DE L'ALKYLATION DES POLYMERES

Le greffage de chaînes latérales hydrocarbonées sur un polymère peut accroître son adsorption sur des surfaces comme l'hydroxyapatite et apporter ainsi une contribution au contrôle du processus de dissolution. Ce greffage des chaînes non fonctionnelles constitue l'alkylation (voir Chap II).

Dans cette partie de notre travail, nous avons évalué l'effet de la longueur des chaînes latérales ainsi que leur nombre (taux de greffage) sur l'inhibition de la dissolution. Cet effet sera estimé par comparaison à une cinétique de référence et à celui obtenu avec PEI 500 précédemment étudiée. Les solutions de polymères testées sont à la concentration de 0,005g% (m/v) et correspondent aux dérivés PEI.Me, PEI.G₃ et PEI.G₇, tous couplés aux anions Cl⁻.

Ce sont donc des chlorhydrates. La structure chimique de ces polymères est la suivante:

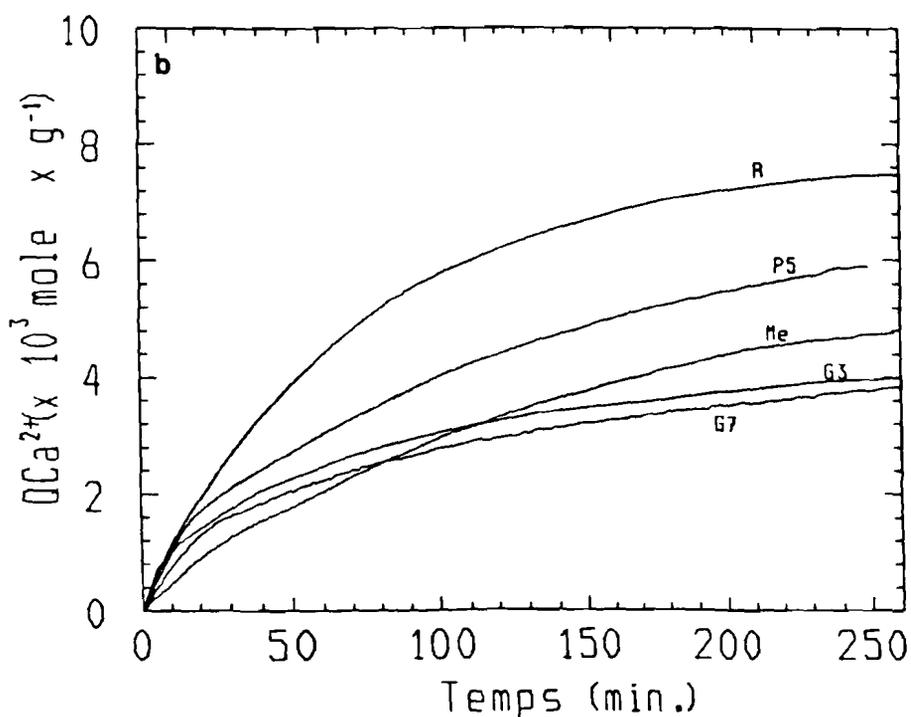
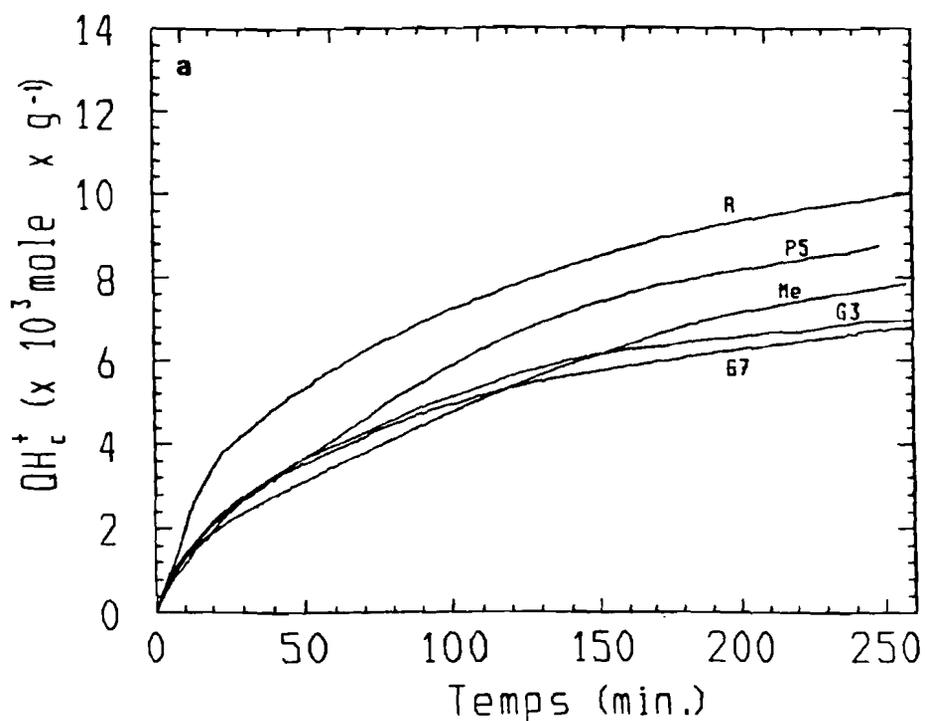
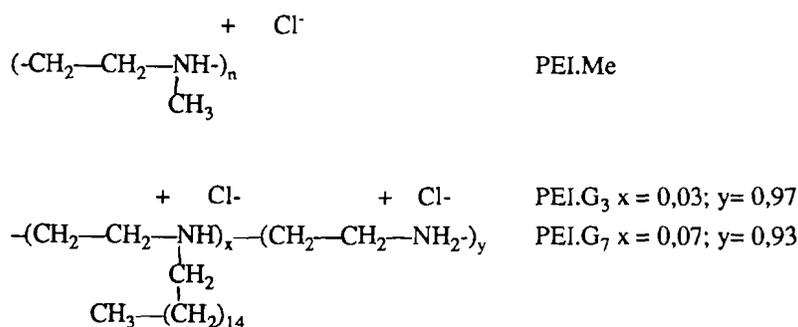


Figure IV-8 (a,b): Cinétiques de consommation des protons (a) et de libération du calcium (b) en présence des chlorures de PEI alkylées; comparaison avec PEI 500 (P5) et une cinétique de référence (R). Me = PEI.Me; G3 = PEI.G₃; G7 = PEI.G₇.



IV-2.C.1. Consommation des protons et libération de calcium

Les figures IV-8(a b) montrent que l'inhibition du processus de dissolution augmente avec la longueur et le nombre de chaînes latérales greffées sur PEI 500.

En considérant une analyse quantitative (les protons consommés et le calcium libéré), les taux de dissolution en présence de ces polymères alkylés, après environ 4 heures d'expérience, sont présentés dans le tableau IV-4.

	Ref		PEI 500		PEI.Me		PEI.G ₃		PEI.G ₇	
	H ⁺	Ca ²⁺	H ⁺	Ca ²⁺	H ⁺	Ca ²⁺	H ⁺	Ca ²⁺	H ⁺	Ca ²⁺
%dissolution	71	71	63	59	58	48	50	42	49	40

Tableau IV-4: Taux de dissolution en présence de PEI (linéaire et alkylés), estimés par rapport aux protons consommés et au calcium libéré, comparés à la référence, au terme de 250 minutes de dissolution.

Par rapport à PEI 500, les dérivés alkylés inhibent plus et favorisent une accumulation plus importante de calcium à l'interface. La différence des taux de conversion, estimés à partir du calcium et des protons, montre qu'en présence des polymères la dissolution de l'hydroxyapatite est un processus non congruent.

La différence des effets induits par PEI.G₃ et PEI.G₇ n'est pas significative. L'efficacité semble alors indépendante du nombre des chaînes latérales, quand les taux de greffage sont faibles.

Si l'inhibition globale par les PEI.G₃ et G₇ est supérieure à celle due à PEI.Me et PEI 500, nous observons néanmoins une accélération initiale des cinétiques en présence des premiers par rapport aux seconds. Un tel effet résulte probablement d'une protonation supplémentaire des PEI.G₃ et PEI.G₇ suivie d'un déplacement du calcium lors de l'adsorption des polymères pendant les instants initiaux de la dissolution.

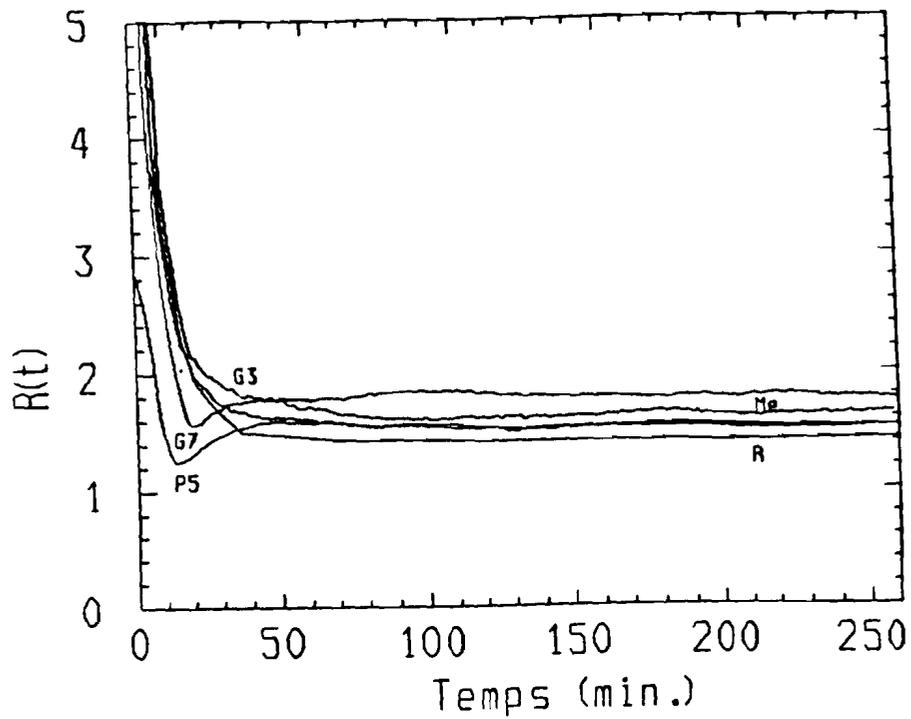


Figure IV-9: Influence de l'alkylation de PEI sur l'évolution du rapport de congruence, en fonction du temps. R = référence; G3= PEI.G₃ G7 = PEI.G₇; Me = PEI.Me; P5 = PEI 500.

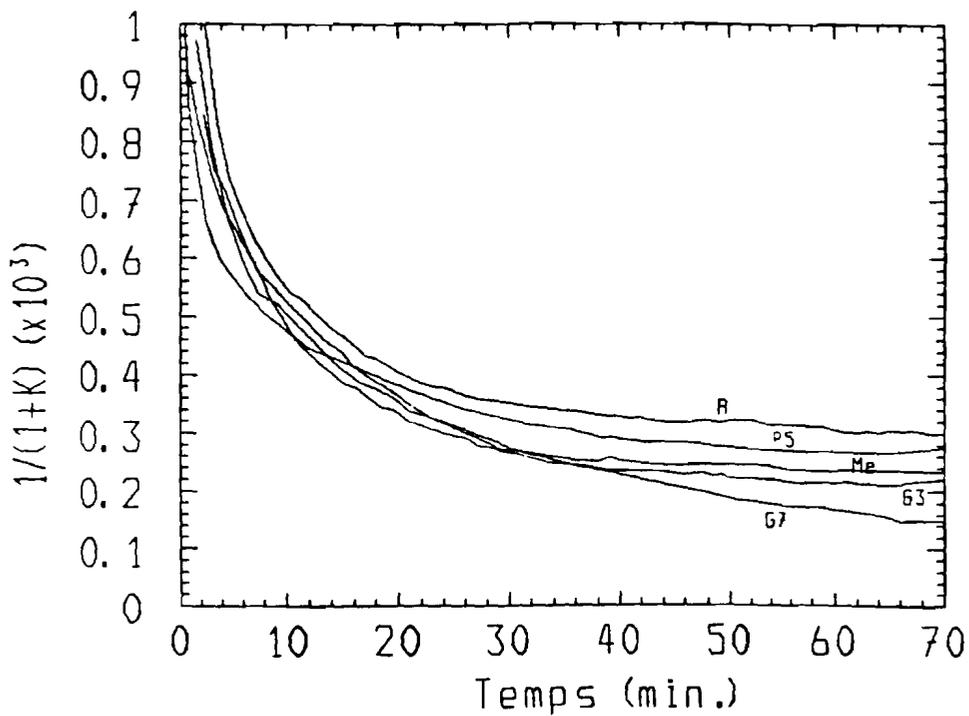


Figure IV-10: Effets de l'alkylation de PEI sur l'évolution en fonction du temps du facteur caractéristique de l'inhibition.

L'adsorption des PEI alkylées semble donc plus importante que celle des PEI linéaires, car favorisée par les interactions hydrophobes *Joao et coll.*, (1990). Cette adsorption plus forte associée à l'effet de masse permet d'expliquer une inhibition plus importante en présence des PEI alkylées par rapport aux PEI linéaires.

IV-2.C.2. Le rapport de congruence

Sur la figure IV-9, le comportement des polymères alkylés vis à vis de l'accumulation du calcium apparaît plus clairement.

Le rapport de congruence $R(t)$ reste constamment au dessus de la valeur théorique de 1,4. Les valeurs élevées de $R(t)$ observées en présence des polymères alkylés correspondent à une accumulation plus importante de calcium à l'interface.

En présence de PEI.Me et PEI.G₃, l'évolution de $R(t)$ est identique à celle d'une cinétique de référence, tout en restant supérieure à 1,4. En comparant les valeurs de $R(t)$ pour ces trois polymères, nous pouvons dire que l'accumulation de calcium à la surface de l'apatite est d'autant plus importante que le nombre de chaînes latérales sur un polymère alkylé adsorbé est important.

IV-2.C.3. Quantification de l'inhibition

La figure IV-10 montre l'évolution de $1/(1+K)$ en fonction du temps en présence des polymères alkylés.

L'allure des cinétiques (fig.IV-8 a, b) montre que la dissolution n'est pas encore achevée; mais, compte tenu de leur évolution, il faudrait encore plusieurs heures pour atteindre l'équilibre thermodynamique. Si pour les polymères paraffinés, on peut penser que l'on se trouve proche de l'équilibre, il n'en est pas de même pour PEI.Me où on note encore une évolution cinétique. Pour la détermination de K , nous avons considéré l'activité à saturation du calcium par rapport à l'apatite ($1,569 \times 10^{-3}M$).

Les valeurs de K après 10 et 25 minutes de dissolution sont données (tableau IV-5).

	Ref	PEI 500	PEI.Me	PEI.G ₃	PEI.G ₇	t(min)
K x 10 ³	1,835	2,088	2,079	1,908	1,996	10
	2,739	2,941	3,367	3,215	3,215	25

Tableau IV-5: Valeurs du paramètre caractérisant l'inhibition pour les différents polymères alkylés (après 10 et 25 minutes de dissolution).

Dans l'intervalle de temps allant de 0 à 120 minutes, il n'est pas surprenant de trouver des valeurs de K plus grandes pour PEI.Me que pour PEI.G₃ et PEI.G₇. En effet, c'est la période où les cinétiques en présence de ces polymères sont accélérées.

Remarque: Dans cette série de polymères, l'examen de l'activité du calcium en solution, déterminée à 250 minutes de dissolution, montre une diminution systématique en fonction de la structure du polymère. Les valeurs expérimentales de l'activité au terme de cette période de dissolution sont données dans le tableau IV-6

	Ref	PEI 500	PEI.Me	PEI.G ₃	PEI.G ₇
a(x10 ⁻³)M	1,098	0,909	0,766	0,744	0,740

Tableau IV-6: Activités ioniques du calcium en solution après 250 minutes de dissolution de 10mg de HAS à pH 5, en présence des polymères indiqués.

La diminution des valeurs de l'activité du calcium en solution est parallèle à l'augmentation de celles de K. Ceci traduit la difficulté qu'ont les ions calcium à traverser la membrane dont l'efficacité est renforcée par les polymères de mieux en mieux adsorbés sur l'apatite.

IV-2.C.4. Conclusion

Les effets de l'alkylation de PEI sur la dissolution peuvent se résumer de la manière suivante:

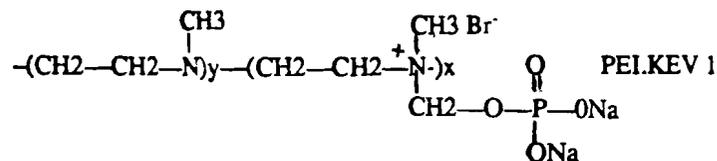
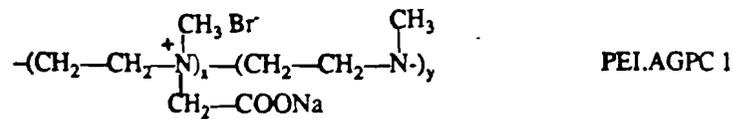
- 1- selon un aspect quantitatif, l'alkylation augmente l'inhibition de la dissolution de l'hydroxyapatite, probablement en raison d'une adsorption plus importante;
- 2- cette inhibition est d'autant plus tardive que le polymère comporte de longues chaînes latérales. Ceci est vérifié par l'accélération des cinétiques en présence des PEI.G₃ et PEI.G₇ par rapport à PEI.Me pendant les instants initiaux de la dissolution.

L'effet des chaînes paraffiniques devient manifeste dans les stades avancés de la dissolution. L'inhibition la plus forte est atteinte avec PEI.G₇ qui renforce mieux la sélectivité de la membrane et conduit par conséquent à une accumulation interfaciale plus importante de calcium.

IV-2.D. EFFETS DE LA FONCTIONNALISATION DES POLYMERES

Les polymères fonctionnalisés sont ceux sur lesquels nous avons effectué des greffages de groupements chimiques acides portés par des chaînes à deux carbones. Les dérivés testés rassemblent également, outre la fonction dont l'effet sera évalué, des groupements méthyles (voir Chap II). Ces polymères comportent donc des ammoniums quaternaires (30%) et des amines tertiaires (70%). Cette quaternisation introduit dans la macromolécule des sites cationiques permanents indépendants du pH. La présence simultanée des sites cationiques (ammoniums) et des fonctions acides (anions) fait de ces polymères des molécules amphotères.

Les fonctions greffées sur PEI.Me sont de type carboxylique et phosphonate. Nous évaluerons ainsi l'efficacité propre de chacune d'elles par rapport à l'autre. Les polymères testés sont ceux désignés PEI.AGPC 1 et PEI.KEV 1. Dans les deux cas, le contre-ion est Br⁻; leurs structures sont les suivantes:



$$x = 0,3 \text{ et } y = 0,7.$$

Dans le paragraphe précédent, nous avons conclu que PEI.G₇ aux temps longs inhibait plus fortement la dissolution que PEI.Me. Le polymère PEI.G₇ et la cinétique de référence constitueront donc la base de comparaison dans la présente étude.

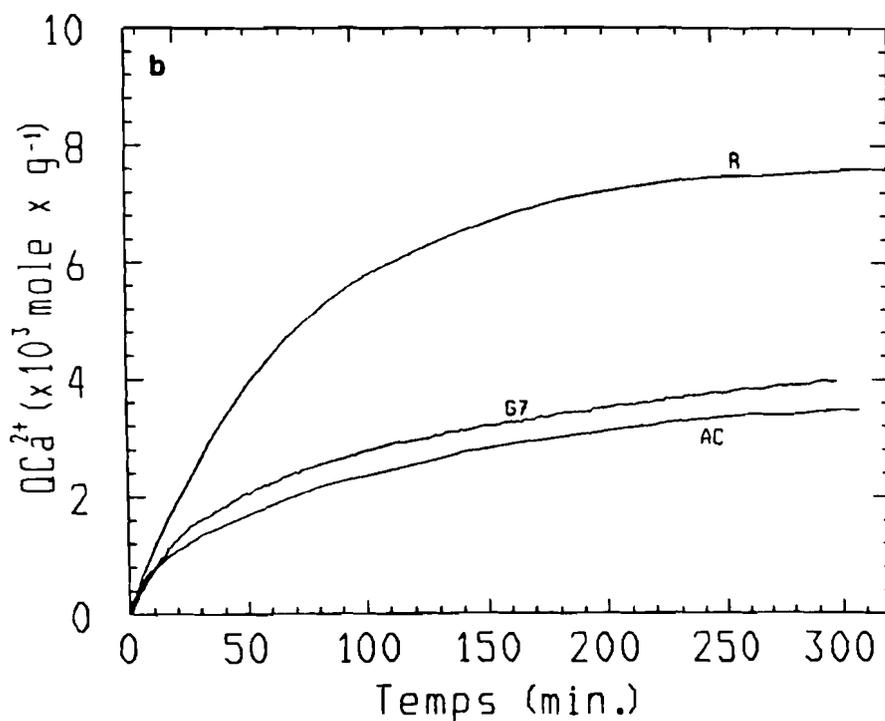
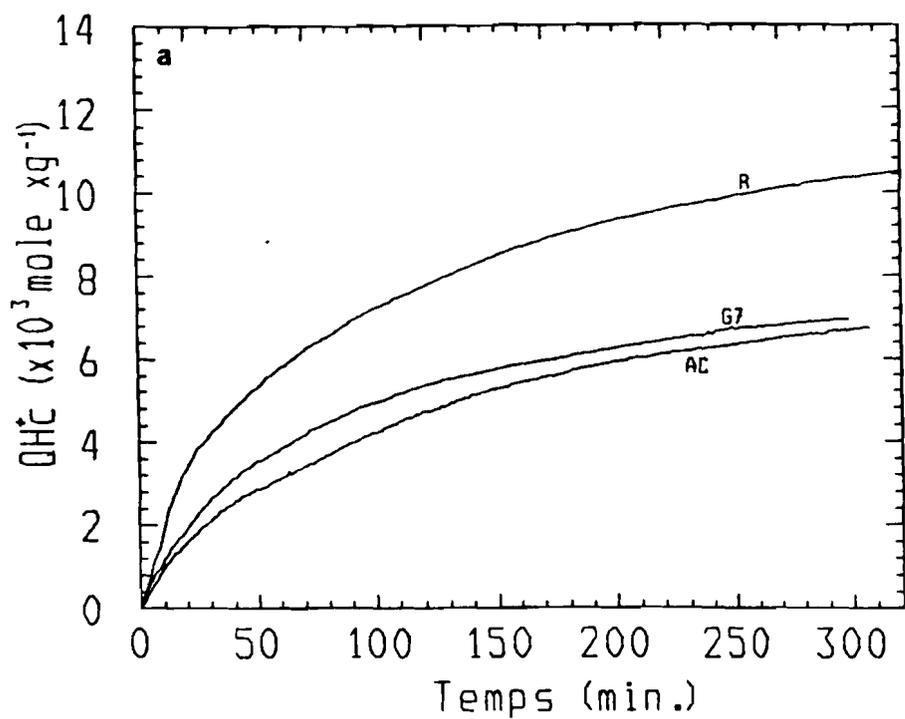


Figure IV-11 (a,b): Cinétiques de consommation des protons (a) et de libération du calcium (b) en présence de PEI.AGPC 1 (AC), comparées à PEI.G₇ (G7) et une cinétique de référence (R).

IV-2.D.1. Effets de la carboxylation de PEI.Me

Le polymère dont les effets sur la dissolution sont étudiés est le composé PEI.AGPC 1.

IV-2.D.1a. Consommation des protons et libération de calcium

Les cinétiques de consommation des protons et de libération de calcium en présence du polymère PEI.AGPC 1 sont présentées dans les figures IV-11(a, b).

D'après ces cinétiques, l'effet de la carboxylation sur la dissolution de l'hydroxyapatite n'est pas significativement différent de celui obtenu en présence de PEI.G₇. Sur la base de la consommation des protons et de libération de calcium en présence de PEI.AGPC 1, les taux de dissolution respectifs au terme de l'expérience sont de 47% et 36%. Ces écarts entre les taux de dissolution en fonction de la base d'évaluation ont déjà été observés avec les PEI alkylées et l'interprétation demeure principalement identique. La différence d'effet entre PEI.AGPC 1 et PEI.G₇ est tout de même assez faible quand on considère que les groupements carboxyliques favorisent l'adsorption sur HAS (*Belton et coll.*, 1983; *Pradip et coll.*; 1980). Ce faible effet résulte probablement d'un échange lent entre les ions Na⁺ et Ca²⁺ (*Kressman et coll.*, 1949) qui limite la chélation du calcium par le polymère.

IV-2.D.1b. Rapport de congruence

L'évolution en fonction du temps du rapport de congruence (figure IV-12) peut permettre de faire une analyse précise des processus qui ont lieu au cours de la dissolution.

En présence de PEI.AGPC 1, l'évolution de R(t) est identique à celle observée avec PEI.G₇. Les processus interfaciaux au début de la dissolution sont donc semblables. Le déficit du calcium en solution lié à son accumulation interfaciale est plus important à la fin de l'expérience pour PEI.AGPC 1.

IV-2.D.1c. Quantification de l'inhibition

Cette quantification se fait en suivant l'évolution de K comme dans les cas précédents (figure IV-13).

L'analyse de R(t) a montré que la dissolution en présence de PEI.AGPC 1 est non congruente. Les cinétiques tendent vers un équilibre. En considérant la saturation par rapport à l'apatite, après 10 et 30 minutes de dissolution, les valeurs de K traduisant

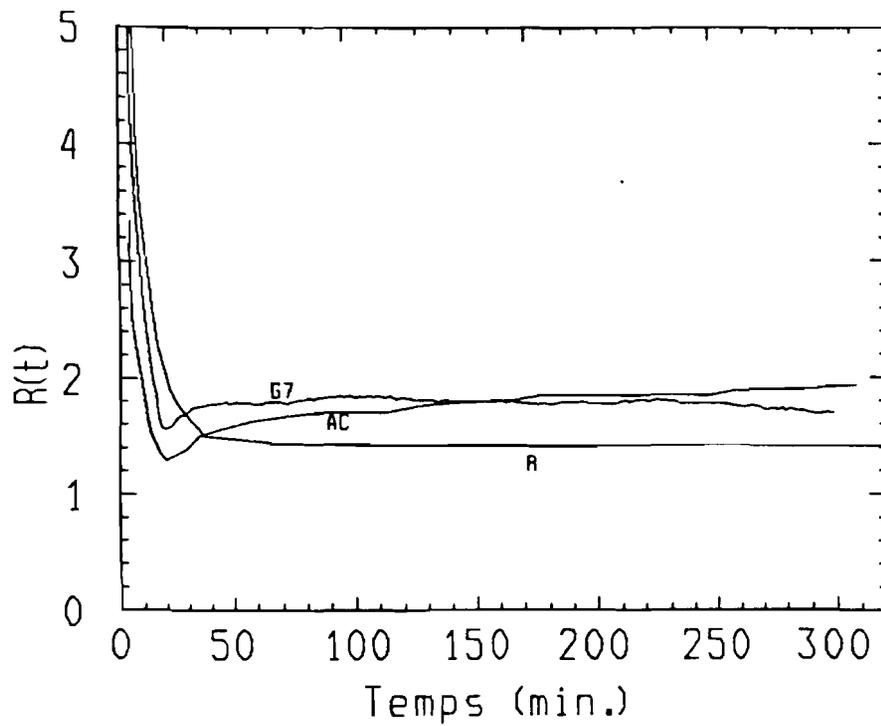


Figure IV-12: Influence de PEI.AGPC 1 (AC) sur l'évolution en fonction du temps du rapport de congruence, par rapport à PEI.G₇ (G7) et une expérience de référence (R).

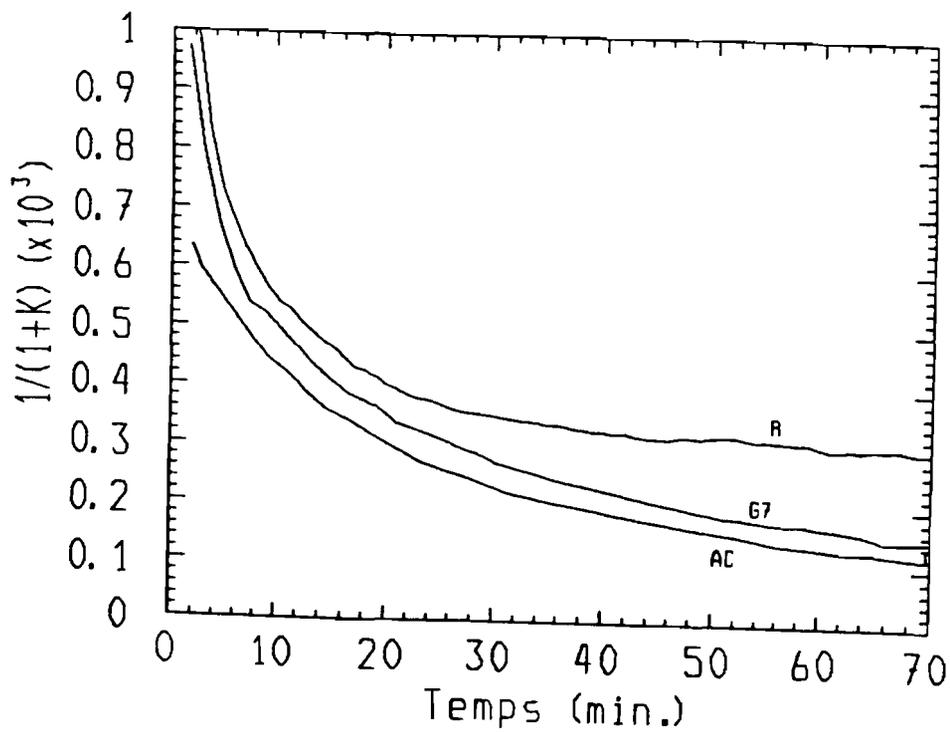


Figure IV-13: Effets de PEI.AGPC 1 (AC) sur l'évolution en fonction du temps du facteur $1/(1+K)$. G7 = PEI.G₇; R = référence.

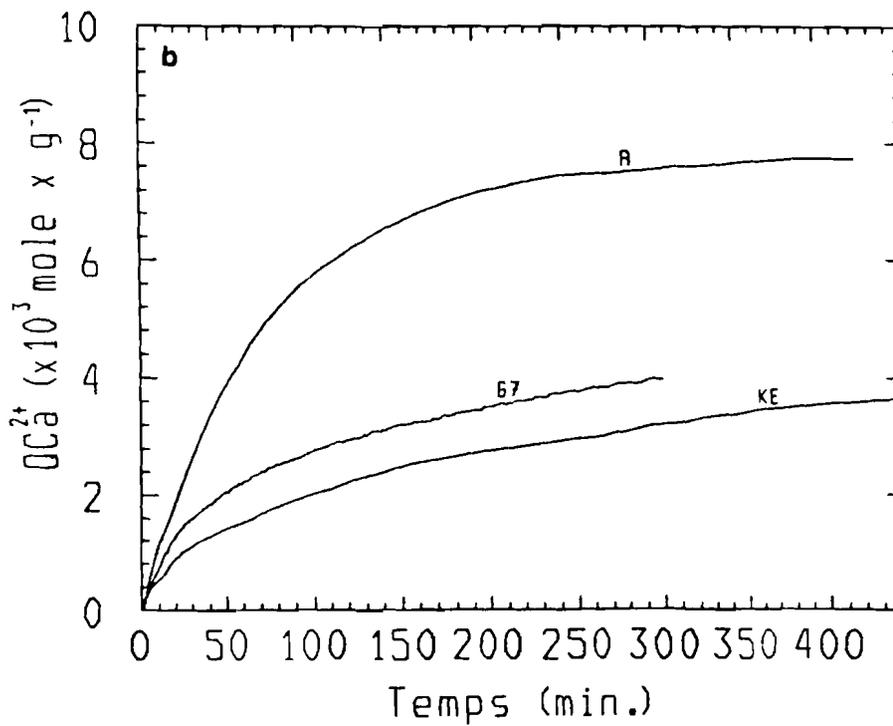
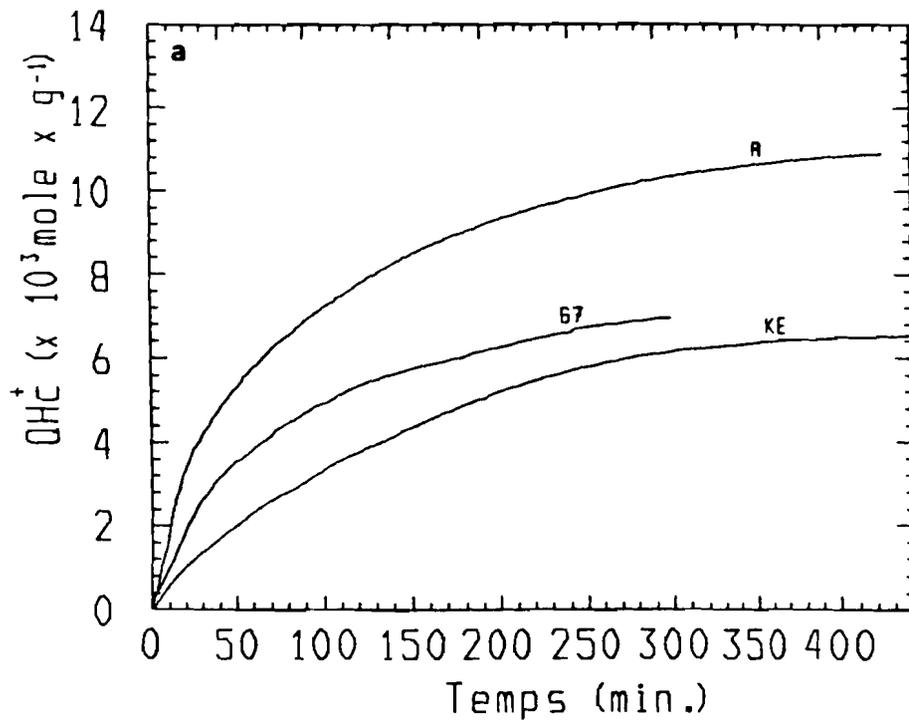


Figure IV-14 (a,b): Influence de la phosphorylation de PEI.Me sur les cinétiques de consommation de protons (a) et de libération du calcium (b). KE = PEI.KEV 1; G7= PEI.G₇; R = référence.

l'inhibition par PEI.AGPC 1 par rapport à la cinétique de référence et celle de PEI.G₇ sont présentées dans le tableau IV-7.

	Ref	PEI.G ₇	PEI.AGPC 1	t(min)
K (x10 ³)	1,835	1,966	2,475	10
	2,940	3,584	4,914	30

Tableau IV-7: comparaison des valeurs de K après 10 et 30 minutes de dissolution de 10mg de HAS en présence de PEI.G₇ et PEI.AGPC 1.

Les fortes valeurs de K attestent que PEI.AGPC 1 est un bon inhibiteur comparativement à PEI.G₇. Les polymères carboxylés peuvent, de ce fait, jouer un rôle important dans la recherche des méthodes de prévention de la dissolution des hydroxyapatites.

IV-2.D.2. Effets de la phosphorylation de PEI.Me

Le dérivé phosphorylé, dont les effets sur la dissolution ont été étudiés, est le polymère désigné PEI.KEV 1.

IV-2.D.2a. Consommation des protons et libération de calcium

Puisque la comparaison des cinétiques se fait avec PEI.G⁷ alors que les durées des périodes de dissolution sont différentes, une première évaluation se fera dans les limites de l'expérience en présence de PEI.G₇. Par la suite, l'effet de PEI.KEV 1 sera analysé sur toute la durée de dissolution.

Les cinétiques (figure IV-14 a,b) montrent un décalage net entre PEI.G₇ et PEI.KEV 1. Après 5 heures la dissolution en présence de PEI.KEV 1, les taux de conversion estimés à partir de la consommation des protons et la libération de calcium, atteignent respectivement 44% et 32%, plus faibles que ceux obtenus en présence de PEI.G₇. Ce résultat atteste l'effet d'accumulation du calcium en présence de polymère, renforcé par les propriétés chélatrices des groupements phosphates (*Marion et coll.*,1973; *Bartels et coll.*, 1979).

Aux temps longs (440 minutes), les taux de dissolution atteignent respectivement 47% et 36%, sans différences significatives avec les valeurs 44% et 32% obtenues après 5 heures. Cette évolution très lente de la dissolution indique nettement l'atteinte progressive de l'état d'équilibre.

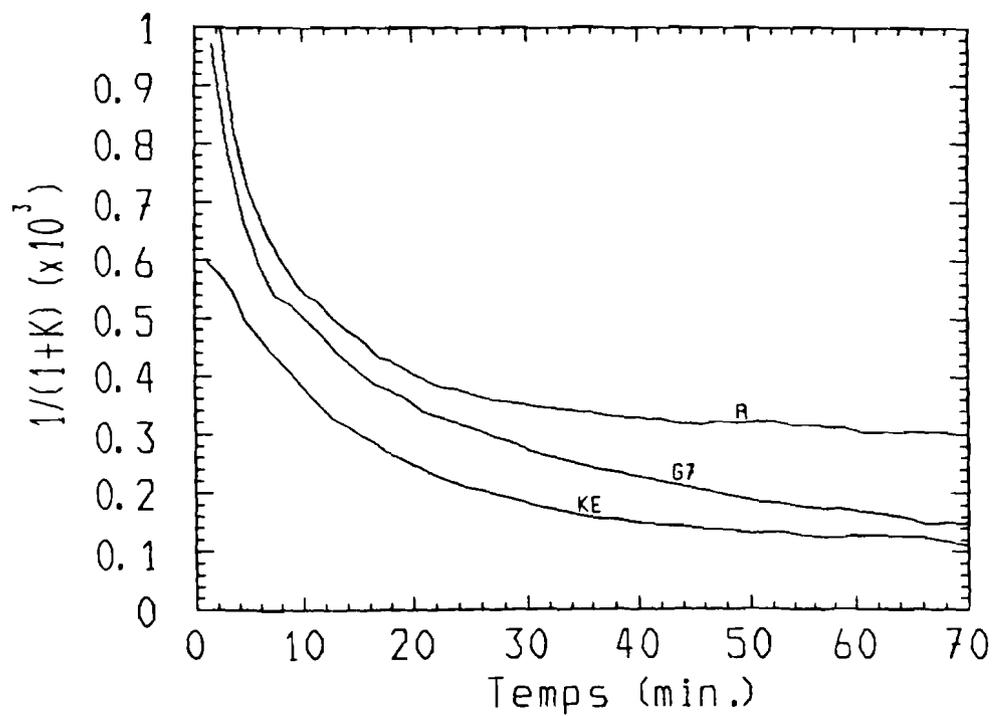


Figure IV-16: Effets de la phosphorylation sur l'évolution en fonction du temps du facteur caractéristique de l'inhibition. KE = PEI.KEV 1;

IV-2.D.2b. Rapport de congruence

$R(t)$ en présence de PEI.KEV 1 (figure IV-15) présente également l'aspect atypique déjà décrit pour les autres polymères.

$R(t)$ prend des valeurs largement supérieures à celles d'un processus congruent, ce qui témoigne à nouveau en faveur d'une accumulation de calcium à l'interface et donc au renforcement de la membrane inhibitrice.

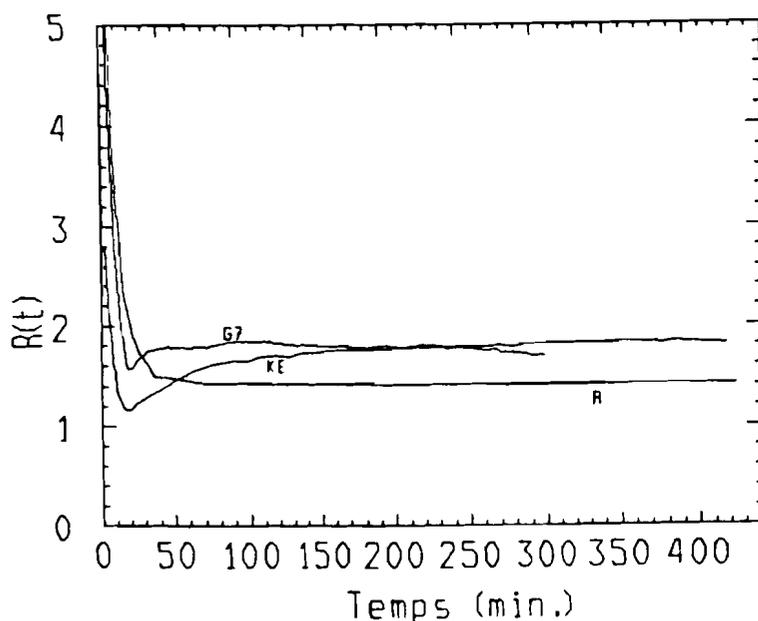


Figure IV-15: Evolution de $R(t)$ en présence de PEI.KEV 1 (KE) comparée à PEI.G7(G7) et à une cinétique de référence (R).

IV-2.D.2c. Quantification de l'inhibition

Bien que les cinétiques de consommation de protons et de libération de calcium indiquent une forte inhibition en présence de PEI.KEV 1, une analyse de la perméabilité de la membrane interfaciale inhibitrice par le biais du paramètre $1/(1+K)$ permet de mieux quantifier cet effet (figure IV-16). La comparaison est faite avec la cinétique de référence et PEI.G₇.

La réduction rapide des cinétiques et la non congruence de la dissolution permettent de dire que les phosphates du polymère influencent la dissolution et par conséquent la saturation de l'interface. Par rapport à l'apatite seule, ces cinétiques montrent bien que la dissolution est fortement retardée. L'activité du calcium dans le réacteur, déterminée à la fin de la période de dissolution est de $7,382 \times 10^{-4}M$, inférieure à l'activité à saturation par rapport à l'apatite. Les valeurs de K calculées en considérant

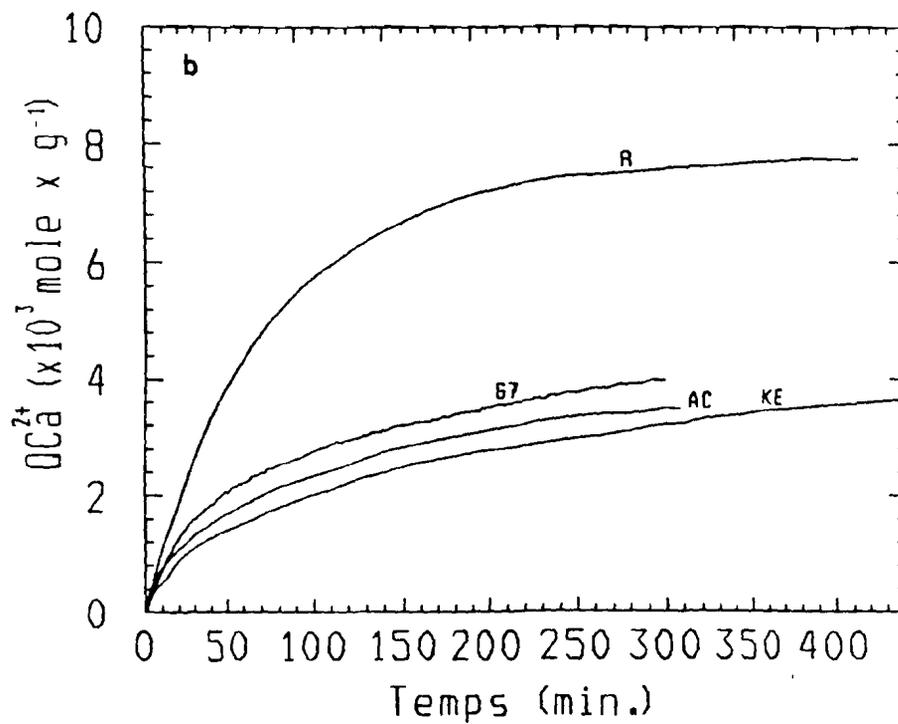
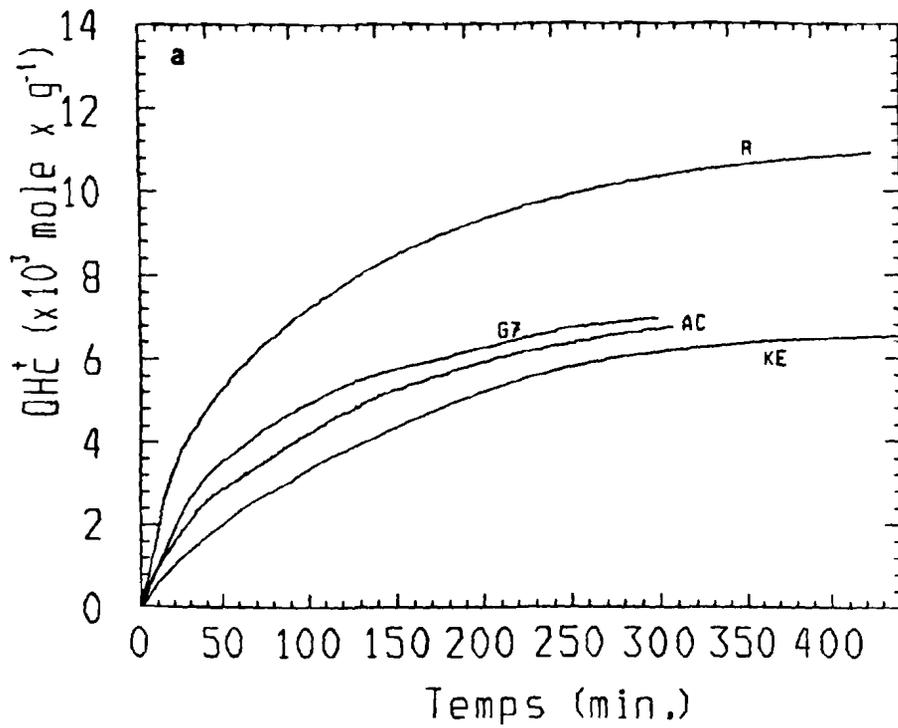


Figure IV-17 (a,b): Comparaison des effets de la fonction de PEI sur la consommation des protons (a) et la libération du calcium (b). AC = PEI.AGPC 1; KE = PEI.KEV 1; G7 = PEI.G₇; R = référence.

une saturation par rapport à l'apatite, après 10 et 30 minutes de dissolution sont les suivantes (tableau IV-8).

	Ref	PEI.G ₇	PEI.KEV 1	t (min)
K (x 10 ³)	1,835	1,966	2,632	10
	2,940	3,584	5,235	30

Tableau IV-8: valeurs de K après 10 et 30 minutes de dissolution en présence de PEI.KEV 1, comparées à celle de PEI.G₇ et la référence.

L'augmentation de K correspond à une diminution de la perméabilité de la membrane, en accord avec les faibles quantités de calcium détectées en solution. Cette évolution de K concorde avec les résultats donnés par le rapport de congruence.

Remarque: Tous les dérivés dont la structure découle d'une transformation de PEI 500 conduisent à une diminution des activités du calcium en solution. Cette décroissance montre bien que les transformations chimiques réalisées sur PEI contribuent à retarder considérablement la dissolution de l'apatite grâce à une retenue supplémentaire du calcium à l'interface apatite/liquide.

Avec les dérivés comportant des groupements phosphates comme PEI.KEV 1, il est difficile de prévoir de quelle manière ces groupements influencent l'état de saturation, et par conséquent les variations de l'activité du calcium en solution. Ainsi dans ce cas de PEI.KEV 1, en supposant la libération de phosphate congruente par rapport à celle du calcium tout au long de la dissolution, si l'on ne prend en compte que l'espèce PO_4^{3-} , sa concentration en fin de dissolution devrait être d'environ $1,3506 \times 10^{-13} M$. Mais par calcul à partir du calcium libéré, la valeur correspondante, en partant du produit de solubilité de l'apatite, est de $3,6914 \times 10^{-13} M$. Il y a donc environ un facteur trois entre ces deux valeurs. Cette analyse montre bien que la dissolution n'est pas congruente entre le calcium et le phosphate. Nous avons montré précédemment que pendant la phase de mise à l'équilibre, le polymère favorisait la libération de phosphate en retenant du calcium. Le présent résultat de non congruence confirme cette donnée.

IV-2.D.3. Comparaison des effets de la fonctionnalisation

Les données sur les cinétiques de consommation des protons et de libération du calcium sont présentées sur les figures IV-17 (a, b).

Ces cinétiques montrent que PEI.KEV 1 inhibe nettement mieux la dissolution que PEI.AGPC 1. Etant donné que le squelette de base du polymère est le même pour

ces deux macromolécules, la différence observée ne peut donc provenir que de la nature des fonctions latérales (*Lindsay et coll*, 1951; *Bonner*, 1954).

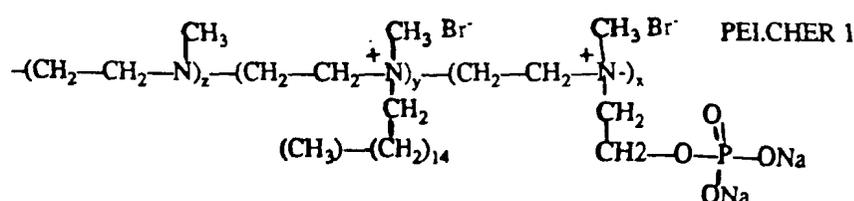
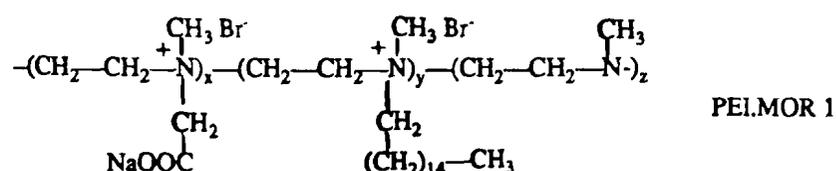
IV-2.D.4. Conclusion

Cette étude montre que les transformations chimiques effectuées sur PEI 500 accentuent l'inhibition, et ceci est d'autant plus remarquable que le polymère est fonctionnalisé. Chaque fonction chimique possède des caractéristiques spécifiques qui conditionnent sa réactivité vis-à-vis des produits de dégradation ainsi que la surface de l'apatite, déterminant alors les capacités intrinsèques à inhiber la dissolution. Ces capacités semblent plus développées pour le polymère comportant des groupements phosphates (PEI.KEV 1) que celui associé aux groupements carboxyliques (PEI.AGPC 1), d'où la supériorité de l'effet inhibiteur noté à l'avantage de PEI.KEV 1.

IV-2.E. EFFETS DES POLYMERES DE STRUCTURE HETEROGENE

Nous avons montré dans les paragraphes précédents que l'alkylation et la fonctionnalisation de PEI induisent individuellement des effets inhibiteurs considérables sur la dissolution de l'hydroxyapatite. Le but de notre travail étant la recherche des moyens d'optimiser cette inhibition, nous avons étudié les effets que produirait une association structurale alkyle-fonction au sein d'une même macromolécule. Nous avons à cet effet synthétisé deux familles de polymères de structure hétérogène à distribution spatiale aléatoire, regroupant chacune l'ensemble des modifications chimiques décrites au niveau des dérivés précédemment étudiés. Les méthodes de synthèse sont développées au chapitre II.

Les polymères obtenus sont totalement monométhylés, portent en moyenne 5% de chaînes paraffiniques et 30% de fonctions carboxyles ou phosphonates. Ces polymères sont en définitive PEI.AGPC.1 et PEI.KEV.1 sur lesquels nous avons réalisé des greffages de la chaîne paraffinique ($C_{16}H_{33}$). Pour rappel, la structure de ces polymères est la suivante:



$$x = 0,3; y = 0,05; z = 0,65.$$

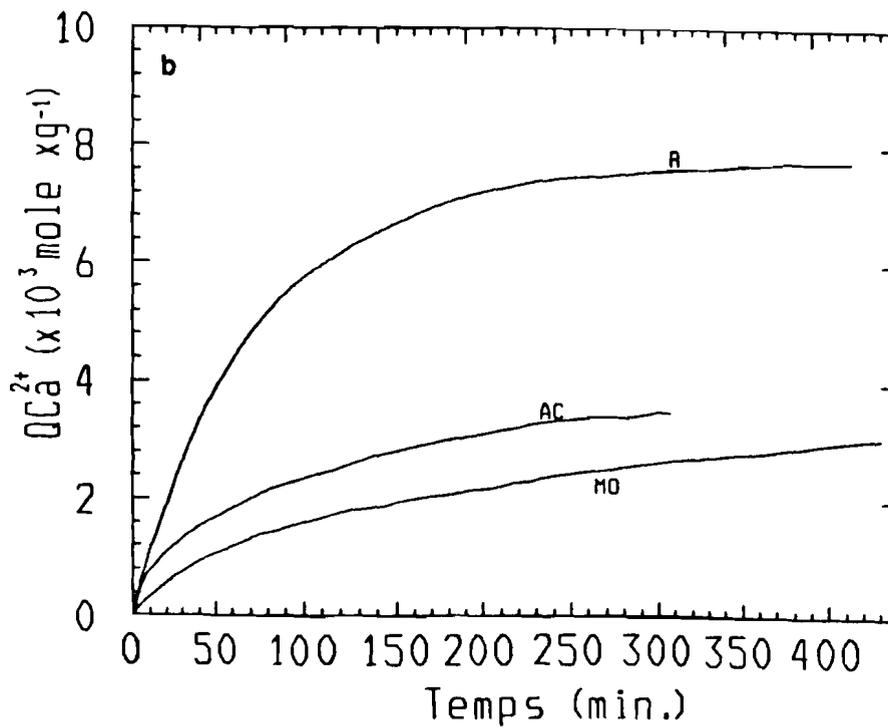
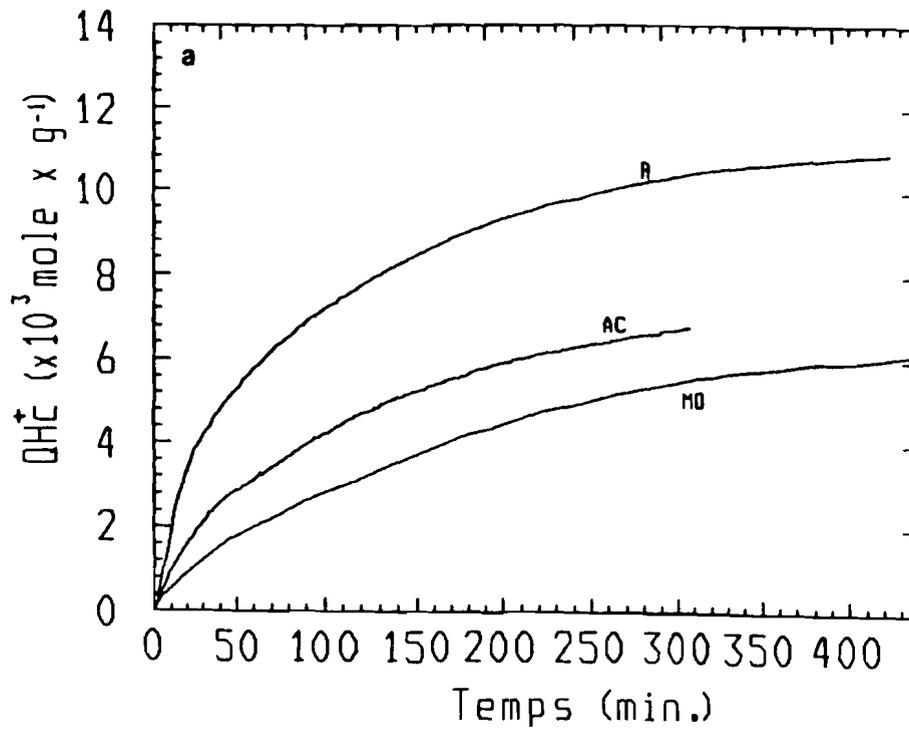


Figure IV-18 (a,b): Cinétiques de consommation des protons (a) et de libération du calcium (b) en présence de PEI.MOR 1 (MO), comparées à PEI.AGPC 1 (AC) et une référence (R).

Nous étudierons d'abord séparément les effets de ces polymères en les comparant avec ceux induits par les dérivés fonctionnalisés à partir desquels ils ont été synthétisés. Les inhibitions obtenues seront ensuite comparées afin d'orienter le choix des polymères qui seront analysés dans la suite de l'étude.

IV-2.E.1. Effets de l'association carboxyle-alkyle

L'association carboxyle-alkyle a permis d'obtenir le polymère PEI.MOR 1. La molécule comprend 35% de sites quaternaires avec Br⁻ comme contre-ion.

IV-2.E.1a. Consommation des protons et libération du calcium

Les cinétiques de consommation des protons et de libération du calcium, figures IV-18(a, b), permettent de voir que le polymère PEI.MOR 1 donne une inhibition plus forte que PEI.AGPC 1. Les taux de dissolution estimés après environ 7 heures, en présence de PEI.MOR 1 sont respectivement de 44% et 32%.

Nous avons précédemment montré que malgré une faible différence, PEI.AGPC 1 inhibait néanmoins mieux la dissolution que PEI.G₇, pour les mêmes conditions expérimentales. Les taux de dissolution plus faibles en présence de PEI.MOR 1 permettent de conclure que l'association carboxyle-alkyle accentue encore les capacités inhibitrices de la molécule. Les résultats pour la comparaison sont résumés dans le tableau IV-9.

	Ref	PEI.AGPC 1	PEI.MOR 1
Ions considérés	H ⁺ Ca ²⁺	H ⁺ Ca ²⁺	H ⁺ Ca ²⁺
%Dissolution	80 80	47 36	44 32
Temps(min.)	440	300	440

Tableau IV-9: Taux comparés de dissolution de HAS en présence de PEI.MOR 1 et PEI.AGPC 1 et pour la cinétique de référence. La durée de la phase de dissolution est indiquée dans la dernière ligne.

IV-2.E.1b. Rapport de congruence

L'évolution du rapport de congruence en fonction du temps, en présence de PEI.MOR 1 est présentée sur la figure IV-19.

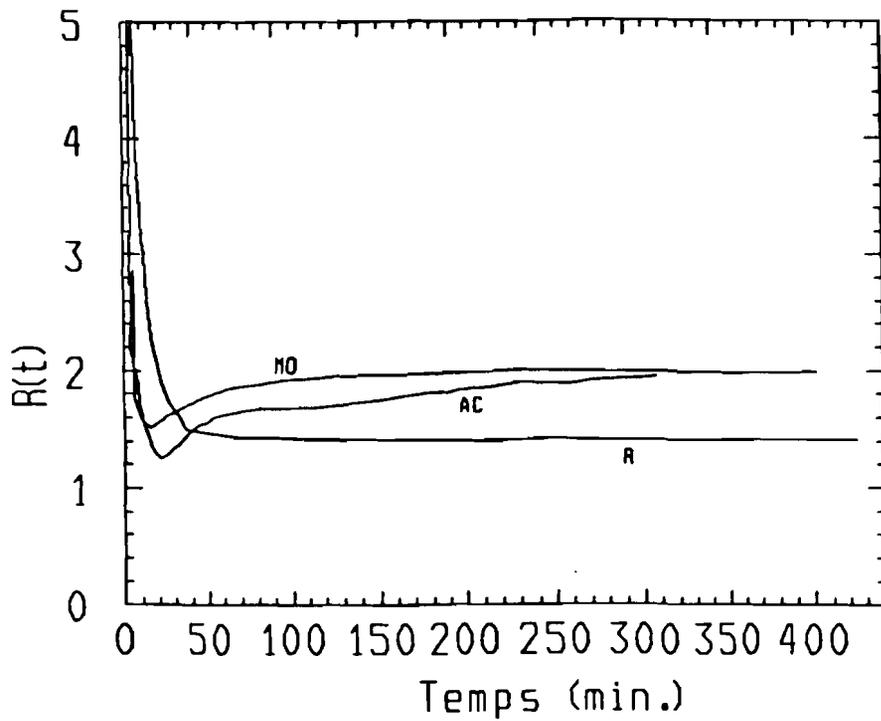


Figure IV-19: Influence de PEI.MOR 1 (MO) sur le rapport de congruence; comparaison avec PEI.AGPC 1 (AC) et une référence (R).

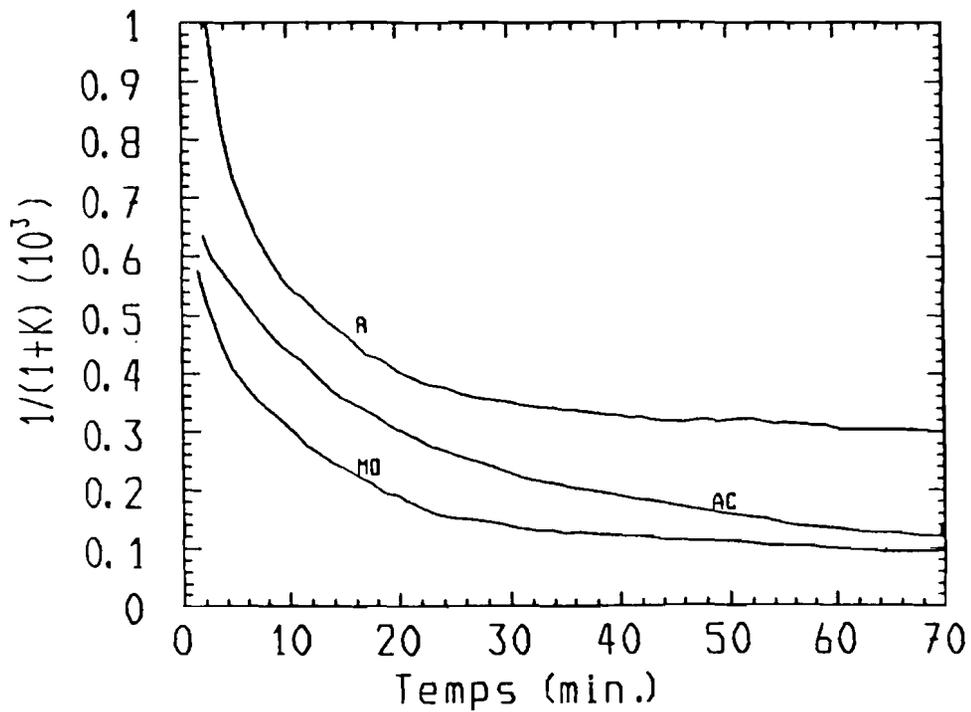


Figure IV-20: Evolution en fonction du temps du facteur $1/(1+K)$ en présence de PEI.MOR 1 (MO), PEI.AGPC 1 (AC) et une référence (R).

En présence de PEI.MOR 1, $R(t)$ est largement au dessus de la valeur théorique de congruence ainsi que celles traduisant l'effet de PEI.AGPC 1. Ces fortes valeurs de $R(t)$ permettent une fois de plus de déduire que le polymère accentue l'accumulation interfaciale de calcium et que la dissolution est non congruente.

IV-2.E.1c. Quantification de l'inhibition.

En se basant sur l'allure des cinétiques de consommation des protons et de libération du calcium en présence de PEI.MOR 1, il est évident que ce polymère induit une forte inhibition. Elle se caractérise notamment par une forte diminution de l'activité ionique du calcium en solution, puisque cette activité à la fin de l'expérience n'est que de $7,18 \times 10^{-4} M$. L'analyse de $R(t)$ indique que la dissolution en présence de PEI.MOR 1 n'est pas congruente. De plus, les cinétiques malgré une forte décélération, montrent que le processus n'a pas encore tout à fait atteint l'état d'équilibre. Considérant une saturation par rapport à l'apatite, l'évolution de $1/(1+K)$ en fonction du temps est présentée (figure IV-20).

La diminution du rapport $1/(1+K)$ au cours du temps montre que la perméabilité de la membrane décroît considérablement. Après 10 et 30 minutes de dissolution en présence de PEI.MOR 1, K prend les valeurs suivantes (tableau IV-10).

	Ref	PEI.AGPC 1	PEI.MOR 1	temps
K ($\times 10^3$)	1,835	2,475	3,205	10
	2,940	4,914	6,579	30

Tableau IV-10: valeurs de K après 10 et 30 minutes de dissolution en présence de PEI.MOR 1.

IV-2.E.1d. Conclusion

Les résultats obtenus montrent que l'association alkyle- carboxyle (PEI.MOR 1) augmente considérablement les potentialités inhibitrices des polymères, car l'effet induit est supérieur à celui individuellement engendré par chacune des composantes de la nouvelle structure. Cette inhibition est considérable puisque le taux maximum de dissolution n'est que de 44%. La présence de ce polymère à l'interface renforce la barrière de diffusion.

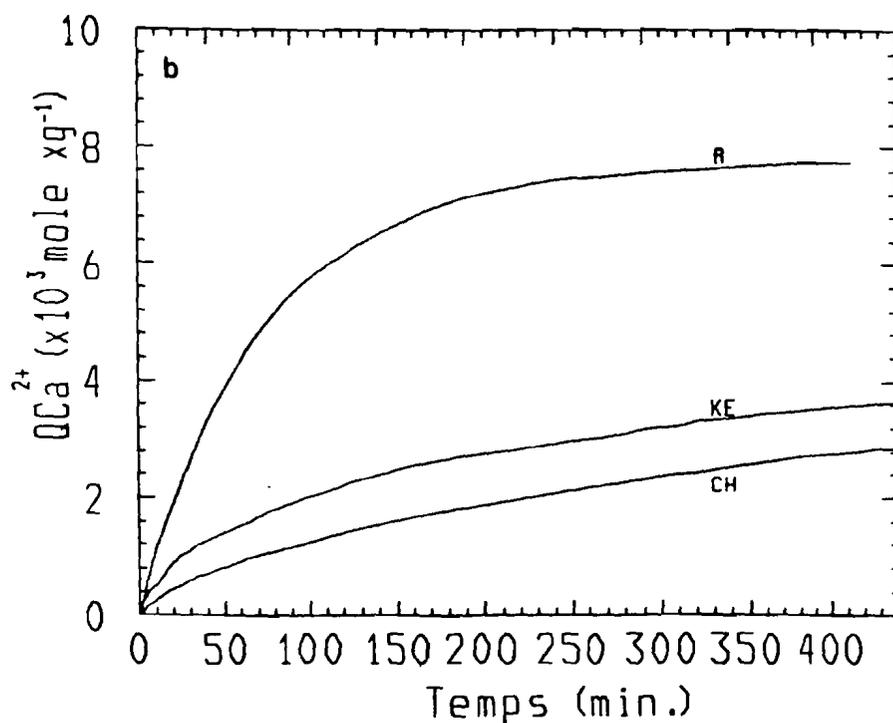
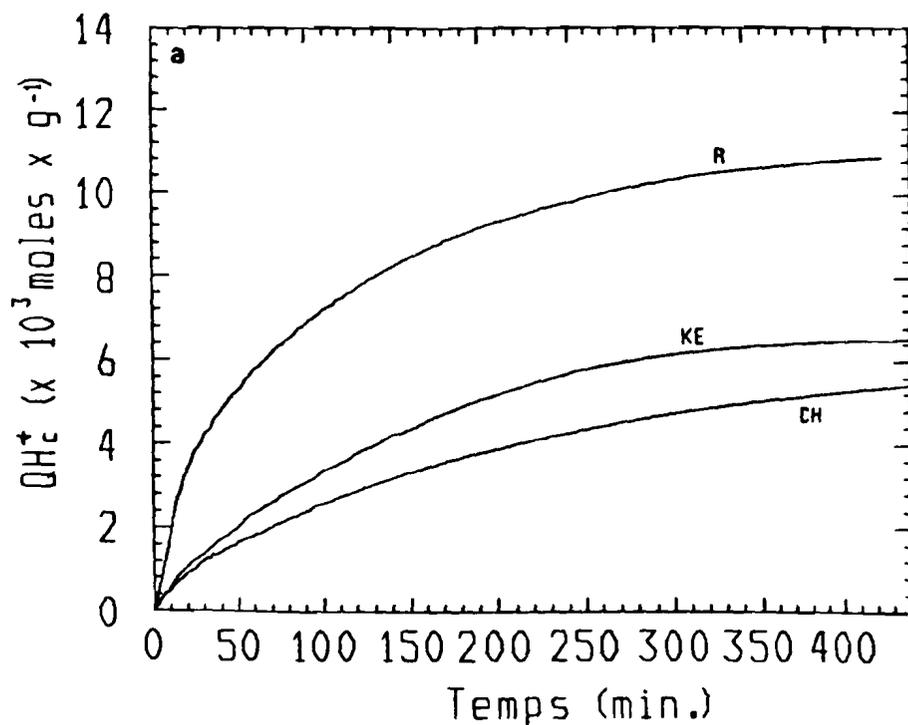


Figure IV-21 (a,b): Cinétiques de consommation des protons (a) et de libération du calcium (b) en présence de PEI.CHER 1 (CH), comparées à PEI.KEV 1 (KE) et une référence (R).

IV-2.E.2. Effets de l'association phosphonate-alkyle

L'association alkyle-phosphonate au niveau du squelette PEI 500 permet la synthèse d'un polymère de structure hétérogène que nous avons désigné par PEI.CHER 1. Ses effets sur la dissolution seront comparés à ceux induits par PEI.KEV 1 et une cinétique de référence.

IV-2.E.2a. Consommation des protons et libération du calcium

Les figures IV-21(a, b) montrent que PEI.CHER 1 induit nettement une inhibition plus forte que celle obtenue avec PEI.KEV 1.

D'après les quantités totales de protons consommés et de calcium libéré en présence de PEI.CHER 1, les taux de dissolution ne sont plus que 39% et 28%. Cet effet, résultant de l'association, s'apprécie mieux en comparant les taux de dissolution atteints en présence des composants les plus inhibiteurs de PEI.CHER 1, pris séparément (tableau IV-11).

	Ref		PEI.KEV 1		PEI.G ₇		PEI.CHER 1	
	H ⁺	Ca ²⁺	H ⁺	Ca ²⁺	H ⁺	Ca ²⁺	H ⁺	Ca ²⁺
%Dissolution	80	80	47	36	49	40	39	28
Temps(min.)	440		440		300		440	

Tableau IV-11: Taux de dissolution en présence de PEI.CHER 1, comparés à ceux d'une référence, PEI. KEV 1 et PEI.G₇. La durée de la phase de dissolution dans chaque cas est indiquée en bas du tableau.

En considérant une durée expérimentale identique pour les trois polymères présentés dans ce tableau, il apparaît que le polymère de structure hétérogène PEI.CHER 1 engendre une inhibition supérieure à celles induites par les substituants considérés individuellement. Ce résultat montre alors l'intérêt d'une telle association.

IV-2.E.2b. Rapport de congruence.

La figure IV-22 montre l'évolution du rapport de congruence en fonction du temps. Les valeurs de R(t) en présence de PEI.CHER 1 restent largement supérieures à celles obtenues dans le cas de PEI.KEV 1, traduisant ainsi et comme on pouvait s'y attendre, en tenant compte des résultats de l'alkylation et de la fonctionnalisation, une importante accumulation interfaciale de calcium.

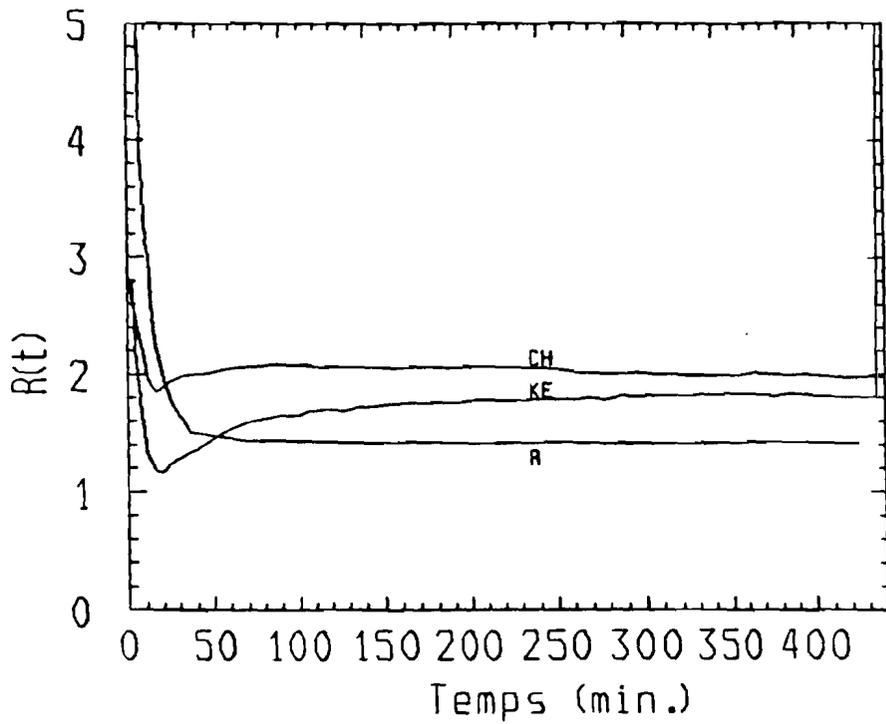


Figure IV-22: Variations en fonction du temps du rapport de congruence en présence de PEI.CHER 1 (CH), PEI.KEV 1 et une référence (R).

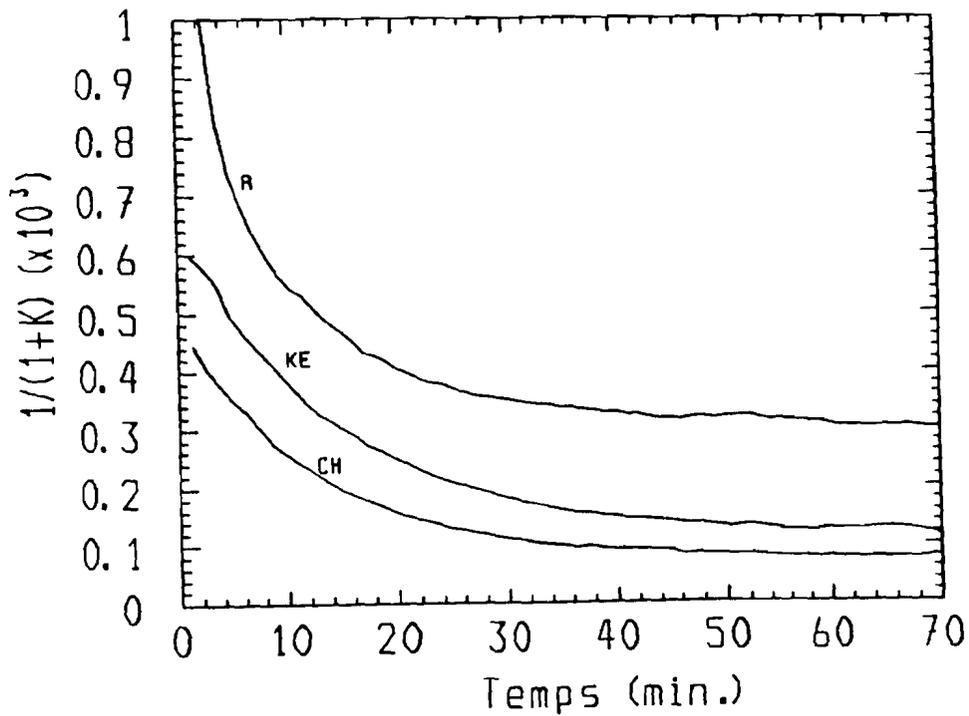


Figure IV-23: Influence de PEI.CHER 1 (CH) sur l'évolution du facteur $1/(1+K)$ en fonction du temps, comparée à PEI.KEV 1 (KE) et une référence (R).

IV-2.E.2c. Quantification de l'inhibition

La dissolution de l'hydroxyapatite est inhibée de manière significative en présence de PEI.CHER 1. Cette forte inhibition se signale par une faible activité du calcium en solution ($6,364 \times 10^{-4} \text{M}$) à la fin de l'expérience.

Cette faible activité du calcium dans le réacteur montre bien que le polymère retarde considérablement la dissolution et en particulier la diffusion du calcium à travers la membrane interfaciale. Malgré la non atteinte expérimentale de l'équilibre thermodynamique, nous considérons comme précédemment une saturation par rapport à l'apatite pour calculer le facteur $1/(1+K)$ dont l'évolution en fonction du temps est présentée sur la figure IV-23.

La détermination de K après 10 et 30 minutes de dissolution donne les valeurs suivantes (tableau IV-12).

	Ref	PEI.KEV 1	PEI.CHER 1 t(min.)	
K (X 10 ³)	1,835	2,632	3,861	10
	2,940	5,235	8,695	30

Tableau IV-12: Valeurs de K après 10 et 30 minutes de dissolution de HAS en présence des polymères indiquées.

IV-2.E.2d Conclusion

L'association alkyle-phosphonate accentue l'inhibition de la dissolution par rapport à chacun des substituants pris individuellement. Cette forte inhibition est liée à une importante diminution de la perméabilité de la membrane chargée (fortes valeurs de K), renforcée par le polymère. L'importante accumulation du calcium à l'interface est suivie d'une libération non congruente de phosphate, permettant ainsi de se rapprocher de l'équilibre thermodynamique. PEI.CHER 1 retarde considérablement la dissolution de l'apatite et permet de conclure que l'association structurale potentialise les capacités intrinsèques de la macromolécule à inhiber la dissolution.

IV-2.E.3. Comparaison des effets de PEI.MOR 1 et PEI.CHER 1.

Nous avons également voulu comparer directement les effets sur la dissolution des 2 polymères PEI.MOR 1 et PEI.CHER 1. Comme on le constate aisément (figures IV-24(a,b)), les effets inhibiteurs induits par PEI.CHER 1 sur la consommation des protons et la libération du calcium sont supérieurs à ceux de PEI.MOR 1.

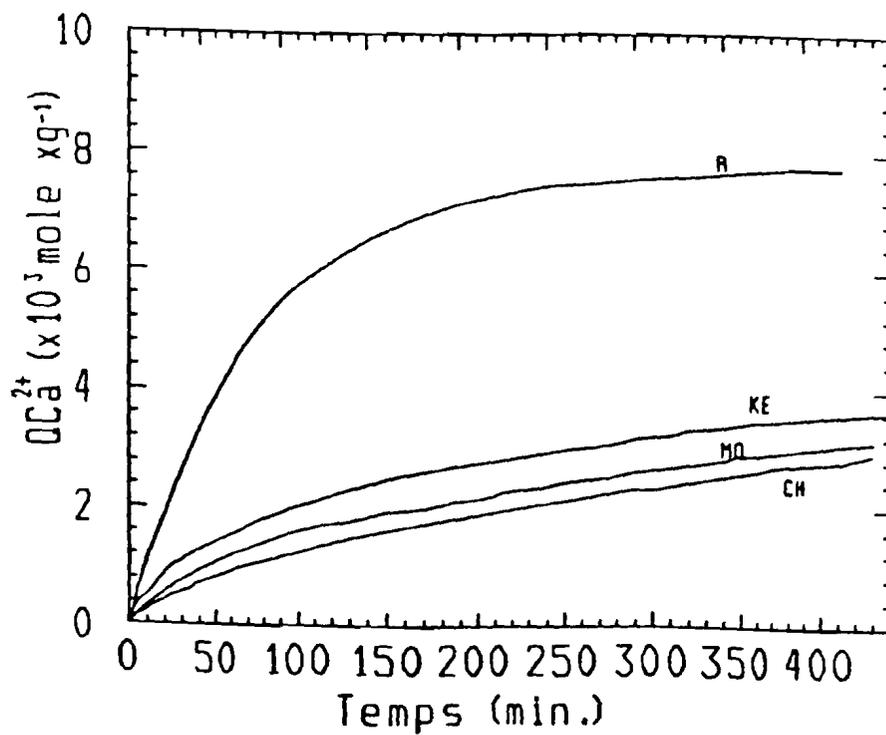
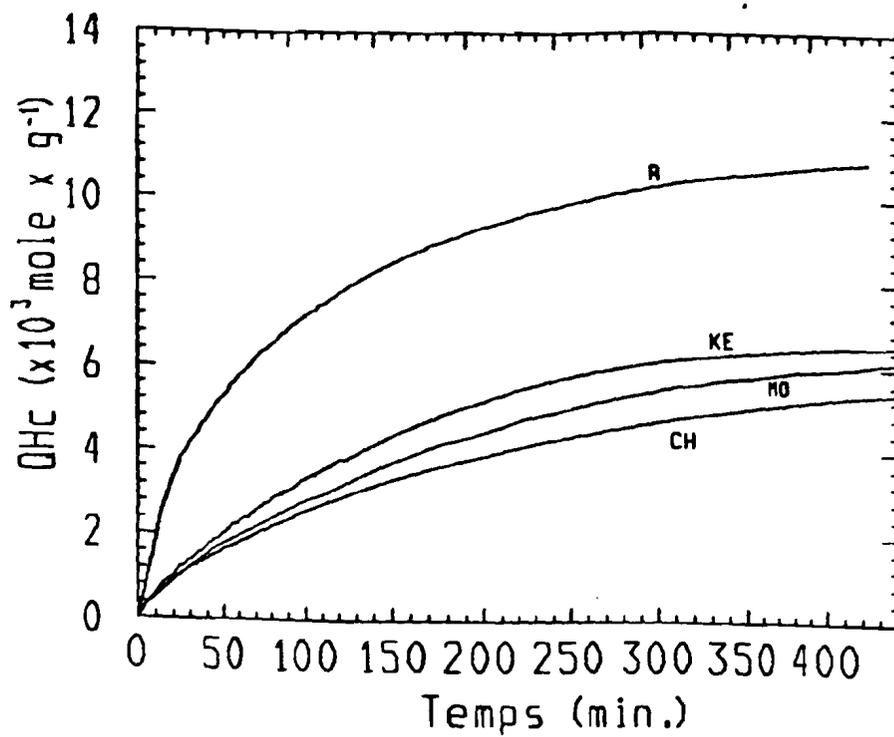


Figure IV-24 (a,b): Comparaison de effets de PEI.CHER 1 (CH) et PEI.MOR 1 (MO) sur les cinétiques de consommation des protons (a) et de libération du calcium (b).

Le tableau IV-13 montre les taux de dissolution atteints en présence des PEI de structure hétérogène (PEI.MOR 1 et PEI.CHER 1), comparés à ceux résultant des expériences en présence de PEI.AGPC 1, PEI.G₇, PEI.KEV 1 ainsi qu'une cinétique de référence.

Ref	PEI.G ₇	PEI.AGPC 1	PEI.KEV 1	PEI.MOR 1	PEI.CHER 1
Ions	H ⁺ Ca ²⁺				
%D	78 78	49 40	47 36	47 36	44 32
Temps	440	300	300	440	440

Tableau IV-13: Taux de dissolution (%D) obtenus en présence des principaux polymères étudiés pour l'analyse des effets intrinsèques. La durée de la phase de dissolution est indiquée dans chaque cas sur la dernière ligne du tableau.

En ne s'intéressant qu'aux polymères de structure hétérogène, il est clair que PEI.CHER 1 inhibe plus fortement la dissolution que PEI.MOR 1, l'écart moyen des taux de dissolution étant d'environ 5%.

Etant donné que l'inhibition la plus importante notée au cours de cette étude préliminaire a été induite par PEI.CHER 1, il nous a paru intéressant d'étudier l'influence de la concentration de cette macromolécule sur le processus de dissolution de l'hydroxyapatite.

IV-2.E

4. Influence de la concentration de PEI.CHER 1 sur le processus de dissolution de l'hydroxyapatite

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré qu'en présence d'une solution de PEI.CHER 1 dont la concentration est de 0,005g% (m/v) dans le réacteur, le taux de dissolution au terme de l'expérience variait entre 26% et 39%. Pour approfondir cette étude, nous avons choisi arbitrairement deux concentrations plus fortes, 0,01g% et 0,05g% et analysé les incidences sur la dissolution.

Ce choix arbitraire est justifié par le fait que nous n'avons pas étudié l'adsorption de ce polymère sur l'apatite.

Les conditions expérimentales restent par ailleurs identiques à celles présentées au chapitre III et les paragraphes précédents; seule la concentration de PEI.CHER 1 varie.

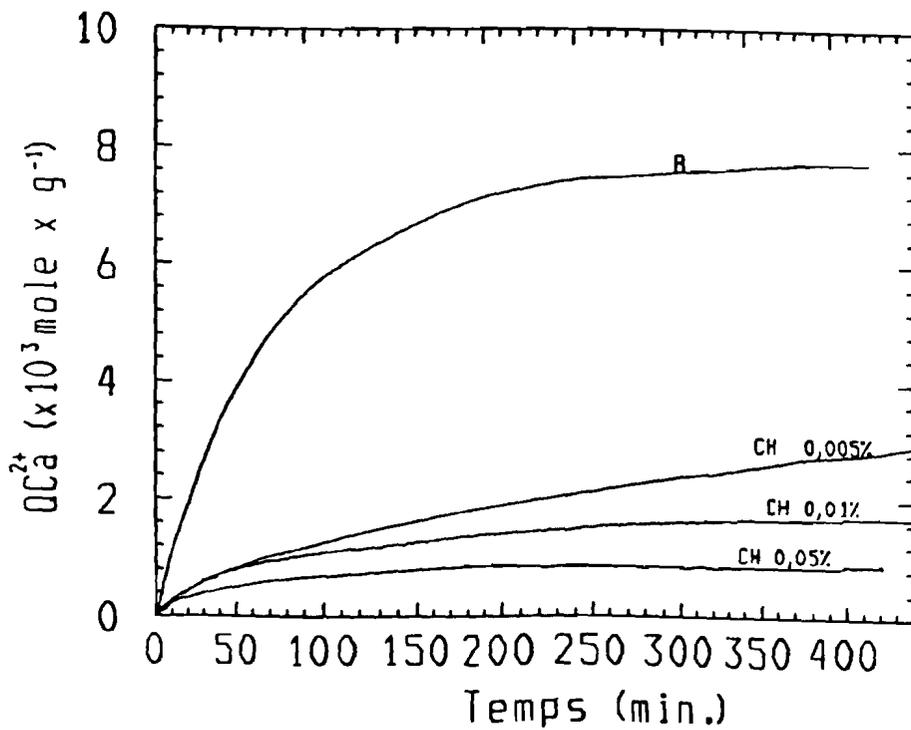
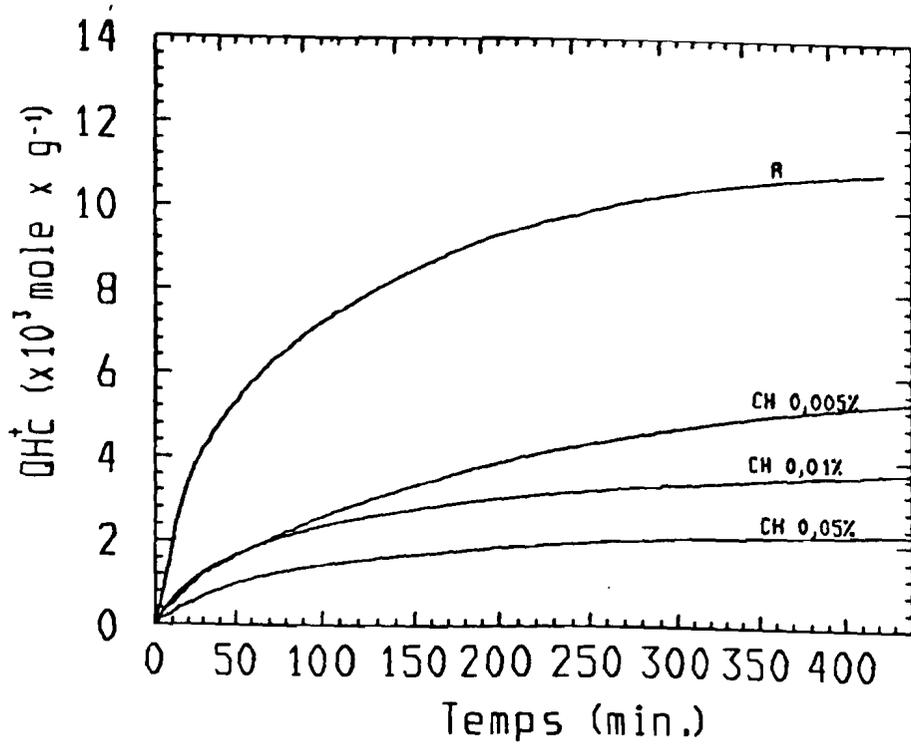


Figure IV-25 (a,b): Effets l'augmentation de la concentration de PEI.CHER 1 (CH) sur la consommation de protons (a) et de libération de calcium (b), lors de la dissolution de 10mg de HAS à pH 5.

IV-2.E.4a. Consommation des protons et libération du calcium

Les cinétiques de consommation des protons et de libération du calcium par HAS au cours de la dissolution en présence de PEI.CHER 1 aux concentrations de 0,01g% et 0,05g% sont données dans les figures IV-25 (a, b).

Pendant la première heure de dissolution, il n'y a pas de différence entre les effets obtenus en présence de 0,005g% et 0,01g% de PEI.CHER 1. Un décrochage net des cinétiques se produit ultérieurement, en faveur de la concentration à 0,01%. Les cinétiques ralentissent si bien que le processus de dissolution semble complètement stoppé. A la fin de l'expérience, par rapport aux protons consommés et au calcium libéré, les taux de dissolution sont respectivement de 27% et 17%, taux qui sont en moyenne de 11% inférieurs à ceux obtenus avec une concentration de 0,005g%.

Lorsque la concentration de PEI.CHER 1 est augmentée à 0,05g%, les cinétiques deviennent beaucoup plus lentes que dans le cas précédent, à un point tel que deux heures seulement après le début de l'expérience, on se trouve quasiment à l'équilibre. A la fin, le taux de dissolution atteint n'est plus que de 16% (à partir des protons consommés) ou de 9% (à partir du calcium libéré).

Les courbes qui résument les effets de la concentration sont présentées dans la figure IV-26. Les effets obtenus sont l'amplification de ceux induits par PEI.CHER 1 à la concentration 0,005g%. Les mécanismes d'action du polymère à ces concentrations sont les mêmes que ceux précédemment présentés.

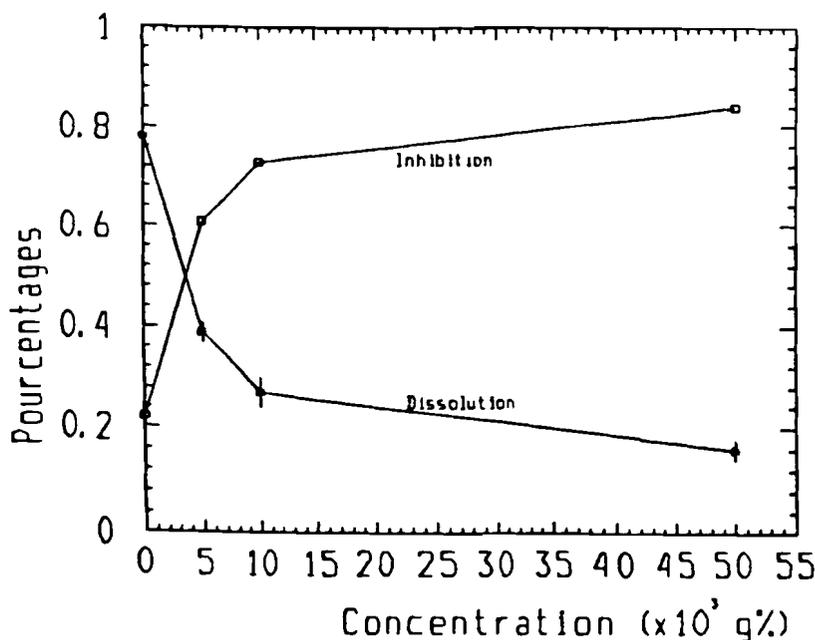


Figure IV-26: Evolution des taux de dissolution et d'inhibition en fonction de la concentration de PEI.CHER 1.

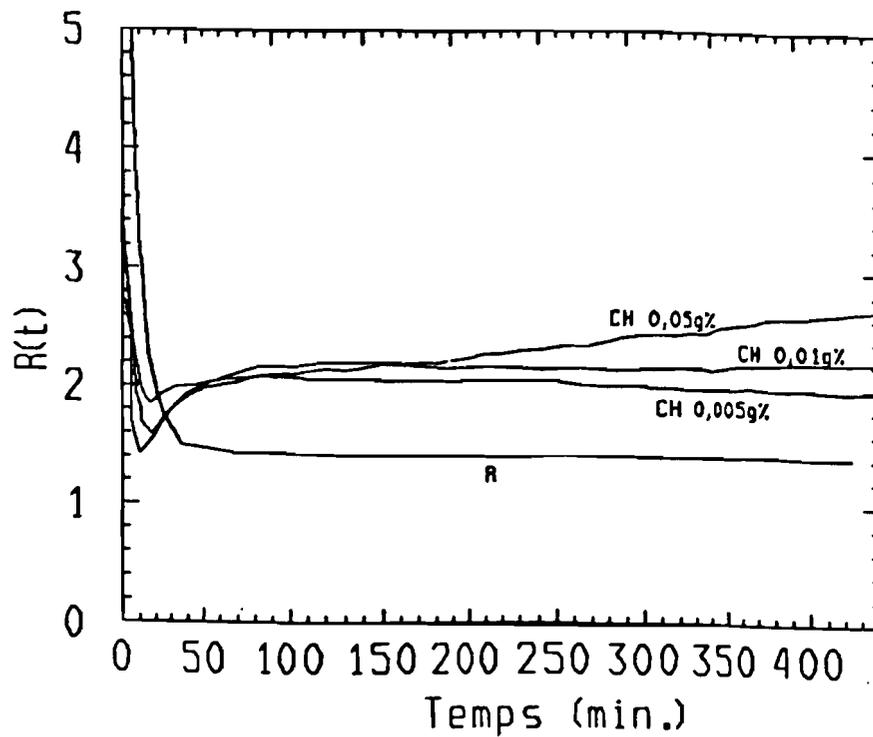


Figure IV-27: Influence de la concentration de PEI.CHER 1 (CH) sur l'évolution en fonction du temps du rapport de congruence.

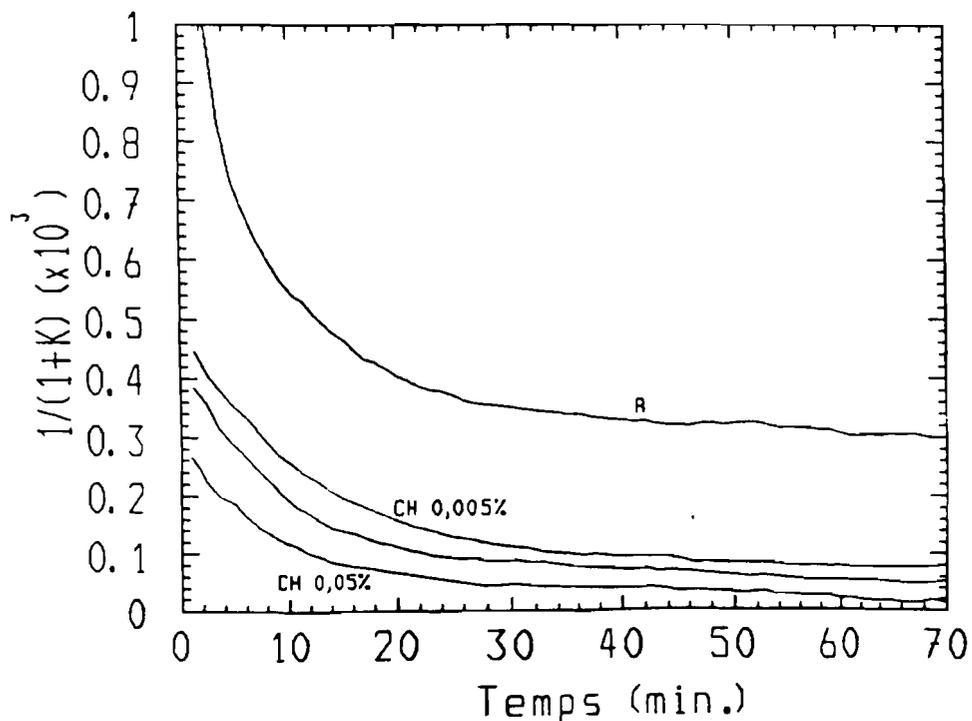


Figure IV-28: Evolution du facteur $1/(1+K)$ en fonction du temps, en présence des concentrations croissantes de PEI.CHER 1 (CH). La courbe sans indication est celle de correspondant à la concentration 0,01g%.

Il est intéressant de noter que dans ces expériences et malgré les fortes concentrations utilisées, il n'y a pas de phase d'accélération initiale, contrairement à ce qui avait été observé avec les polyphosphonates (Thomann, 1989). Cet effet peut s'expliquer par la différence de réactivité entre les fonctions protégées (cas de PEI.CHER 1) et celles qui ne le sont pas.

IV-2.E.4b. Le rapport de congruence

L'effet de la concentration est aussi appréciable à partir de l'évolution de $R(t)$ (figure IV-27). L'accumulation interfaciale de calcium est d'autant plus importante que la concentration de l'inhibiteur est élevée. Comme dans les cas précédents, l'évolution de $R(t)$ permet de dire que la dissolution est non congruente.

IV-2.E.3c. Quantification de l'inhibition

Comme dans les cas des faibles concentrations, une analyse du rapport $1/(1+K)$ en fonction du temps permet de mieux montrer l'effet de la concentration de PEI.CHER 1 sur la dissolution.(figure IV-28)

L'arrêt prématuré de la dissolution montre que la barrière formée par le polymère et les produits de dégradation de l'apatite dans les instants initiaux de la dissolution est très efficace. Elle retarde ou empêche considérablement le passage des ions. Dans ces expériences à fortes concentrations, le processus de dissolution semble atteindre un équilibre thermodynamique ainsi que le montrent les cinétiques. Ce comportement serait lié beaucoup plus à un fort blocage des cinétiques qu'à une atteinte réelle de l'équilibre thermodynamique. L'effet retardateur du polymère sur la dissolution est si important qu'aux concentrations testées, à la fin de l'expérience, l'activité du calcium en solution n'est que de $2,894 \times 10^{-4} \text{M}$ (pour 0,01g%) et de $1,365 \times 10^{-4} \text{M}$ (pour 0,05g%). Les faibles valeurs des activités ainsi obtenues en présence des concentrations plus élevées renforcent l'hypothèse selon laquelle le polymère adsorbé modifie la congruence à l'équilibre. En considérant une saturation par rapport à l'apatite, en présence de PEI.CHER 1 à la concentration de 0,05g%, le facteur caractéristique d'inhibition K prend la valeur $8,264 \times 10^3$ après 10 minutes de dissolution pour atteindre $4,762 \times 10^4$ au bout de 60 minutes.

L'augmentation de la concentration permet au polymère étudié de ralentir considérablement la dissolution de l'hydroxyapatite si bien que pour une concentration de 0,05g% (m/v) la dissolution n'atteint plus qu'un taux maximal de 16%. Nous atteignons ainsi une efficacité intrinsèque maximale par augmentation de la concentration. Ce polymère présente des potentialités considérables et pourra de ce fait jouer un rôle de premier plan dans la prévention de la carie dentaire.

IV-2.F. DISCUSSION

Pour l'ensemble des polymères, on constate qu'en dehors des dérivés de structure hétérogène, l'écart entre les taux de dissolution estimés à partir des protons et du calcium est de l'ordre 9%. Il passe à 12% en présence de PEI.MOR 1 et à 13% dans le cas de PER.CHER 1. Cette simple observation indique bien que l'association structurale amplifie les effets individuels des polymères. De plus comme PEI.MOR 1 et PEI.CHER ont le même squelette de base, la différence des effets induits ne semble liée qu'à la spécificité des fonctions latérales.

Probablement à cause des différences dans les cinétiques d'échange cationique au niveau de ces fonctions (*Bonner 1954; Lindsay et coll., 1951*), le dérivé comportant des groupements phosphates conduit à la meilleure inhibition.

Ces résultats obtenus avec une concentration de 0,005g% de chacun des polymères pour l'évaluation des effets intrinsèques sur la dissolution de l'hydroxyapatite sont très encourageants pour une utilisation clinique. Malgré les limites imposées par notre système expérimental, les résultats permettent de justifier le choix porté sur les structures qui composent les molécules étudiées, et en particulier les polymères de structure hétérogène.

IV.2.G. CONCLUSION

Nous avons observé une diminution progressive des taux de dissolution de l'hydroxyapatite des poly(éthylèneimines) linéaires jusqu'aux PEI de structure hétérogène. Cette diminution est fonction de la masse moléculaire et la structure du polymère. Les différentes modifications effectuées sur PEI 500 contribuent à l'augmentation du pouvoir inhibiteur des polymères vis-à-vis du processus de dissolution. L'association de fonctions particulières et de chaînes hydrophobes dans un seul polymère a permis d'obtenir les taux de dissolution les plus faibles. Le dérivé PEI.CHER 1 résultant de la combinaison des chaînes paraffiniques et des groupements phosphates présente le plus fort pouvoir inhibiteur, s'accroissant avec la concentration.

Le rapport de congruence $R(t)$ indique que chaque modification dans la structure du polymère fait passer sa valeur au dessus de la valeur théorique. Cette augmentation des valeurs de $R(t)$ montre que la complexité structurale du polymère accentue l'accumulation du calcium à l'interface et conduit à son déficit en solution, mais compensé par une importante libération non congruente du phosphate afin de respecter le produit de l'apatite.

Ce résultat a été confirmé par l'étude des effets de la concentration de PEI.CHER 1. La dissolution est non congruente en présence de tous les polymères testés. Le blocage des cinétiques peut résulter dans ces cas soit d'une augmentation de l'épaisseur de la membrane ou alors d'une précipitation du polymère à la surface de l'apatite, formant ainsi une membrane très dense à travers laquelle les produits de dégradation diffusent difficilement. Ces deux aspects peuvent éventuellement se coupler, permettant alors d'expliquer les fortes valeurs du paramètre K, les faibles activités du calcium en solution et la lenteur des cinétiques.

L'évaluation de l'effet de charge ne peut se faire que dans les instants initiaux de la dissolution puisque dans les temps longs, le degré de protonation et donc la densité de charge protonique est en principe identique pour tous ces polymères. En considérant les dérivés quaternisés avec 30 à 35% de charges positives permanentes, indépendantes du pH, on observe une inhibition plus forte aux instants initiaux à l'opposé des cinétiques où le polymère doit d'abord se protoner. Cette charge permet non seulement une adsorption remarquable grâce aux interactions avec les phosphates de la surface (*Bartels et coll.*, 1979), mais aussi un maintien du calcium à la surface de l'apatite grâce à la matrice organique que constitue le polymère (*Bianconi et coll.*, 1991). Le polymère ralentit considérablement la cinétique de dissolution en favorisant l'accumulation interfaciale de calcium et la libération du phosphate vers la solution. Il renforce donc la couche adhérente et la perméabilité de la membrane.

Cette analyse montre que les polymères synthétisés, de par leurs effets intrinsèques, répondent dans une large mesure aux critères retenus pour des inhibiteurs forts. Enfin ce sont les polymères de structure hétérogène et plus particulièrement ceux comportant des groupements phosphates (PEI.CHER 1) qui répondent le mieux aux caractéristiques d'un inhibiteur idéal. Le polymère inhibe la dissolution en bloquant la libération du calcium. Ces polymères et en particulier ceux de structure hétérogène, peuvent donc jouer un rôle de premier plan dans la prévention de la carie dentaire.

Leur conception et leur synthèse ont été orientée grâce aux paramètres donnés par le modèle de dissolution. Les effets escomptés ont été obtenus. Par ce modèle, il est donc possible de prédire la forme sous laquelle un inhibiteur potentiel sera le plus efficace.

CHAPITRE V.

INTERFERENCES DES POLYMERES COUPLES AUX IONS FLUORURES AVEC LA DISSOLUTION DE L'HYDROXYAPATITE

V-1. INFLUENCE DES POLYMERES COUPLES AUX IONS FLUORURES SUR LA MISE A L'EQUILIBRE

V.1.A. Détermination de $[P]_{fe}$

V-2. EFFETS DU COUPLAGE POLYMERES – IONS FLUORURES SUR LA DISSOLUTION DE L'HYDROXYAPATITE

V-2.0. ACTION DU FLUORURE DE SODIUM SUR LA DISSOLUTION DE L'HYDROXYAPATITE

V-2.A. EFFETS DU COUPLAGE PEI LINEAIRES – FLUORURES

V-2.A.1. Consommation des protons et libération du calcium

V-2.A.2. Le rapport de congruence

V-2.A.3. Quantification de l'inhibition

V-2.A.4. Conclusion

V-2.B. EFFETS DU COUPLAGE PEI ALKYLEES – FLUORURES

V-2.B.1. Consommation de protons et libération du calcium

V-2.B.2. Le rapport de congruence

V-2.B.3. Quantification de l'inhibition

V-2.B.4. Conclusion

V-2.C.EFFETS DU COUPLAGE PEI DE STRUCTURE HETEROGENE-FLUORURES

V-2.C.1. Consommation de protons et libération du calcium

V-2.C.2. Le rapport de congruence

V-2.C.3. Quantification de l'inhibition

V-2.C.4. Effets de la concentration de PEI.CHER 2

* Consommation des protons et libération du calcium

* Le rapport de congruence

* Quantification de l'inhibition

V-2.C.5. Conclusion

V-2.D. EVOLUTION DES FLUORURES EN SOLUTION

V-2.D.1. Le fluorure de sodium

V-2.D.2. Le fluorhydrate de PEI N alkylé (PEI.G₇.HF)

V-2.D.3. Le fluorure de PEI quaternisé hétérogène (PEI.CHER2)

V-2.E. DISCUSSION

V-2.F. CONCLUSION

V-1. INFLUENCE DES POLYMERES COUPLES AUX IONS FLUORURES SUR LA MISE A L'EQUILIBRE

Comme indiqué dans le chapitre précédent, une analyse de l'influence du couplage des polymères avec les ions fluorures sur la mise à l'équilibre est importante afin de noter leur incidence sur la composition du milieu réactionnel. Nous suivons la même démarche que dans le chapitre précédent pour la présentation des résultats.

L'addition de la solution de polymère couplé aux ions F⁻ dans le réacteur pendant la phase de mise à l'équilibre (voir chap. III) s'accompagne d'un changement de pH (tableau V-1) suivie d'une modification de la concentration en calcium (tableau V-2).

Les effets des polymères dans cette phase sont identiques dans leur nature à ceux observés avec les dérivés étudiés au chapitre IV (tableau IV-1). On note tout simplement en présence des polymères couplés aux F⁻, une déprotonation plus importante, en tenant compte des protons libérés.

Polymères	Conc. g%(m/v)	pH _i	pH _m	H ⁺ _L x10 ³ moles	pH _f	temps (min)
PEI500HF	0,005	6,98	2,53	14,8	7,08	65
PEIMeHF	0,005	7,30	3,65	1,12	7,15	55
PEIG ₃ HF	0,005	8,50	3,42	1,47	7,23	60
PEIG ₇ HF	0,005	8,70	3,53	1,58	7,21	55
PEI.AGPC2	0,005	7,30	6,99	0,0003	7,45	40
PEI.KEV2	0,005	7,40	6,98	0,00032	7,40	35
PEI.MOR2	0,005	7,15	6,98	0,00034	7,47	45
PEI.CHER2	0,005	7,12	6,88	0,00028	7,45	50

Tableau V-1: Variations du pH par déprotonation instantanée (élimination de Hoffmann) ou par effet de dilution dans le réacteur au moment où l'on ajoute le polymère pendant la phase de mise à l'équilibre. Les concentrations (conc.) des polymères sont exprimées en g%(m/v). pH_i est le pH dans le réacteur avant ajout du polymère alors que pH_m est le pH le plus bas atteint en présence du polymère. H⁺_L indique la quantité (en moles) de protons libérés par le polymère, calculé par différence de pH. pH_f est le pH final atteint après rajout de KOH; le temps moyen au bout duquel le pH se stabilise à la valeur pH_f est en minutes. La détermination des protons libérés par les polymères se fait en considérant que le volume de solution dans le réacteur est 50ml.

L'addition de la poudre d'apatite dans le réacteur est suivie d'une diminution des concentrations en calcium dans la solution. Les valeurs moyennes traduisant l'évolution des ions calcium dans le réacteur depuis l'addition de la poudre jusqu'à la fin de la mise à l'équilibre sont présentées dans le tableau V-2.

	[C°] 10 ³ g%	[F] _i ppm	[Ca] _i 10 ⁵ M	[P] _i 10 ⁵ M	[Ca] _{fe} 10 ⁵ M	[P] _{fe} HAP10 ⁵ M FAP	CaF ₂ pK _s	[F] _{fe} ppm	pH _{fe}
Ref	–	–	3,85	5	5,12	6,29	–	–	7,08
PEI500HF	5	4,2	3,85	5	1,29	24,65	6,29	12,48	6,99
PEIMeHF	5	22	3,85	5	0,77	60,14	7,06	11,29	6,97
PEIG3HF	5	13,6	3,85	5	0,86	32,08	6,29	11,65	7,08
PEIG7HF	5	12	3,85	5	1,42	15,00	10,1	11,53	7,11
PEI.AGPC2	5	4	3,85	5	2,55	18,42	5,87	12,51	7,04
PEI.KEV2	5	2,5	3,85	5	0,89	38,85	7,99	13,38	7,07
PEI.MOR2	5	3,3	3,85	5	1,41	22,57	6,38	12,93	7,06
PEI.CHER2	5	2,5	3,85	5	0,53	94,84	12,9	13,63	7,02
NaF		4,5	3,85	5	2,40	12,20	5,44	12,05	7,20
NaF		14	3,85	5	1,49	14,37	5,43	11,28	7,11
NaF		22	3,85	5	0,83	33,31	6,11	11,15	7,09

Tableau V-2: Variations des concentrations du calcium dans le réacteur en présence de polymères à la concentration ([C°]) de 0,005g%(m/v) et 10mg de HAS, comparées à une référence et à des diverses solutions de NaF. [F]_i est la concentration en F⁻ contenus dans le polymère ou dans la solution de NaF. [Ca]_i = concentration en calcium de la solution "D". [Ca]_{fe} = concentration de calcium dans le réacteur à la fin de la mise à l'équilibre, donnée par l'électrode. [P]_i = concentration en phosphate de la solution "D". [P]_{fe} = concentration de phosphate dans le réacteur à la fin de la mise à l'équilibre. [F]_{fe} = concentration de F⁻ dans le réacteur à la fin de la mise à l'équilibre mesurée par l'électrode. pH_{fe} est le pH à la fin de la mise à l'équilibre.

Les concentrations de calcium dans le réacteur à la fin de la phase de mise à l'équilibre sont plus faibles que celles obtenues avec les polymères seuls (chap IV, tableau IV-2). L'adjonction de F⁻ au polymère conduit donc à un déplacement moindre du calcium de la surface vers la solution.

La différence entre [F]_i et [F]_{fe} représente la concentration des F⁻ adsorbés pendant cette phase de mise à l'équilibre. Pour les polymères il est difficile d'évaluer la quantité de F⁻ adsorbée car on ne connaît pas sa cinétique de libération par le polymère. Dans ce cas, le plus intéressant est de constater que pour ces polymères, tous les F⁻ ne passent pas spontanément en solution. Il reste donc une réserve pouvant être mobilisée, notamment dans le cas des polymères de structure hétérogène, situation non envisageable avec NaF.

V-1.A. Détermination de [P]_{fe}

La solution de dissolution renferme une concentration en phosphate de 5x10⁻⁵M. Il est expérimentalement difficile de suivre l'évolution de ce phosphate en fonction du temps; mais on peut estimer la concentration du phosphate en solution par le biais du produit de solubilité de l'hydroxyapatite. Dans ce cas où les ions F⁻ sont à prendre en

compte, nous avons considéré deux cas limites: soit une saturation par rapport à l'hydroxyapatite pure (HAP) ($K_{sp} = 1,189 \times 10^{-60}$) (Gramain et coll., 1987), ou alors une saturation par rapport à la fluoroapatite (FAP) ($K_{sp} = 2,511 \times 10^{-61}$) (Moreno et coll., 1977) $[P]_{fe}$ est calculée en considérant $[Ca]_{fe}$ et le pH.

Les concentrations du phosphate ainsi calculées à la fin de la mise à l'équilibre par rapport à HAP sont importantes. On peut dès lors penser que la mise en équilibre en présence des polymères couplés aux ions F^- favoriserait la formation d'une structure interfaciale de composition différente. On pourrait d'abord imaginer que le processus s'accompagne d'une dissolution partielle de l'apatite, mais une telle hypothèse est invalidée par la trop faible valeur du calcium en solution. L'effet serait alors essentiellement lié à un fort déplacement du phosphate de surface pendant l'adsorption du F^- . Un résultat semblable avait été trouvé par Gasser et coll. (Communication privée) lors de l'étude de l'adsorption de F^- sur l'apatite.

Par rapport à FAP, les concentrations en phosphate sont plus faibles que dans le cas précédent. On pourrait donc envisager la limitation du processus par la saturation liée à la FAP pendant cette phase. L'analyse des données des concentrations de calcium et de F^- à la fin de la mise à l'équilibre par rapport à CaF_2 ($pK_s = 10,47$) montre également que le processus n'est pas limité par CaF_2 .

En comparant les concentrations du phosphate à la fin de mise à l'équilibre en présence de NaF et les polymères, il ressort que les polymères facilitent la libération du phosphate, comme cela a été observé au chapitre IV (tableau IV-2). Cette libération de phosphate favorise la mise en solution des ions F^- par un processus d'échange.

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment avec les polymères seuls (faible libération de calcium compensée par un déplacement de phosphate).

Des concentrations plus élevées des solutions de polymères de structure hétérogène accentuent les effets précédemment notés (tableau V-3).

	[C°] g%	[Ca] _i 10 ⁵ M	[Ca] _{fe} 10 ⁵ M	[P] _i 10 ⁵ M	[P] _{fe} 10 ⁵ M		pH _{fe}
				HAP	FAP		
	0,005	3,85	2,75	5	89,84	12,63	7,00
PEL.CHER20,010	0,010	3,85	1,76	5	377,10	32,65	7,03
	0,005	3,85	4,43	5	17,45	5,38	6,98
PEL.MOR2	0,010	3,85	3,35	5	56,54	8,68	7,03

Tableau V-3: Effets de la concentration de polymères sur la mise à l'équilibre. Les symboles ont la même signification que dans le tableau V-2.

La concentration du phosphate augmente lorsque la concentration totale en polymère devient importante. Cette augmentation est plus remarquable avec les polymères porteurs de groupements phosphates. Selon les données de l'analyse élémentaire (chap II) une concentration de 0,005g% de PEI.CHER 2 est associée à environ $1,18 \times 10^{-4}$ M de phosphate, alors que 0,01g% contiennent le double. Ces phosphates influencent certainement la mise à l'équilibre.

Tous les échanges entre la solution et la surface de l'apatite conduisent à un équilibre, afin de respecter le produit de solubilité, malgré la non congruence calcium/phosphate dans la solution.

V-2. EFFETS DU COUPLAGE POLYMERES – IONS FLUORURES SUR LA DISSOLUTION DE L'HYDROXYAPATITE.

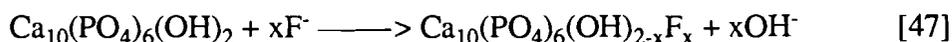
Depuis les premières observations épidémiologiques faites par *Dean* (1938) sur les relations existant entre la fluorose et la carie dentaire, les effets bénéfiques des fluorures sur la prévention de la pathologie carieuse ont été unanimement reconnus.

Des divergences assez nombreuses subsistent pourtant quant à l'interprétation fondamentale des mécanismes, de leur mode d'action sur les tissus dentaires. Ces divergences permettent notamment de comprendre la raison pour laquelle de nombreuses recherches sont consacrées à l'action des fluorures.

Il est néanmoins acquis qu'une fois incorporés dans l'hydroxyapatite, les ions F⁻ réduisent sa solubilité. La recherche d'une optimisation de cette incorporation explique le développement de différents procédés de fluoration présentés dans la littérature. *Dean* (1954) apporte la preuve d'une protection certaine contre la carie par l'ingestion d'une eau renfermant 1 ppm de fluorure. *Arnold et coll.*, (1960) mettent au point des comprimés fluorés pour assurer une supplémentation dans les régions où l'eau ne renferme pas de fluorure. La recherche d'une plus grande efficacité a permis l'arrivée sur le marché des dentifrices de plus en plus enrichis en fluorures que certains auteurs (*Osuji et coll.*, 1988) considèrent comme un facteur de développement des fluoroses dans des régions où l'eau contient 1 ppm de fluor, malgré des résultats controversés (*Houwink et coll.*, 1979).

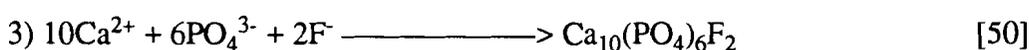
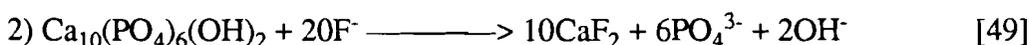
Le problème qui se pose est celui de savoir quel est le mode d'action des ions F⁻ adsorbés sur l'apatite, leur rôle dans le mécanisme de dissolution. Une fois ces interrogations levées, il reste alors à savoir de quelle manière l'on peut optimiser l'action des fluorures en utilisant des quantités relativement faibles sans pour autant en perdre l'efficacité.

Au sein même du cristal d'apatite, l'apport des ions fluorures peut conduire à la formation de nouvelles structures cristallines par l'intermédiaire de la réaction suivante:



avec $0 \leq x \leq 2$

En fonction de la concentration des fluorures et du degré de saturation du milieu, *Mühlemann et coll.* (1957), *White et coll.* (1990) envisagent trois réactions possibles, dérivées de [47].



La réaction [48] a été décrite en présence des solutions dont les concentrations en ions fluorures sont faibles. Il s'agit d'un échange iso-ionique ou substitution isomorphe qui conduit à la formation de fluoroapatite (FAP) dont la solubilité est réduite par rapport à l'apatite pure. Ainsi, et malgré les valeurs relativement différentes données par certains auteurs (*McCann*, 1968; *Brown et coll.* 1977; *Amjad et coll.*, 1981), la moyenne des données de la littérature du produit de solubilité de FAP est d'environ $2,51 \times 10^{-61}$, alors que celui de l'apatite pure est de $1,189 \times 10^{-60}$. Si la substitution est partielle, il se formera de la fluorohydroxyapatite ayant un produit de solubilité intermédiaire entre les deux formes.

La réaction [49] survient quand la concentration en fluorure est très élevée.

Cette brève revue de la littérature montre bien la complexité des problèmes posés par l'utilisation prophylactique des fluorures.

V-2.00. EVOLUTION DES FLUORURES EN SOLUTION

Avant d'étudier les effets des fluorures sur la dissolution, nous avons voulu déterminer leur devenir en solution pendant la mise les périodes de mise à l'équilibre et de dissolution. Les expériences ont été réalisées en présence de solution de NaF et celles des polymères PEI.G₇HF, PEI.CHER 2, préparées de telle sorte qu'elles contiennent initialement 14ppm de F⁻ chacune. (Nous justifierons le choix de ces polymères pour cette étude au paragraphe de la dissolution). Pour les solutions de polymères, nous avons réalisé pour chacune deux types d'expériences: en présence et absence d'apatite. Par l'électrode spécifique de fluorure, nous avons suivi l'évolution des F⁻ en solution dans chacun des cas.

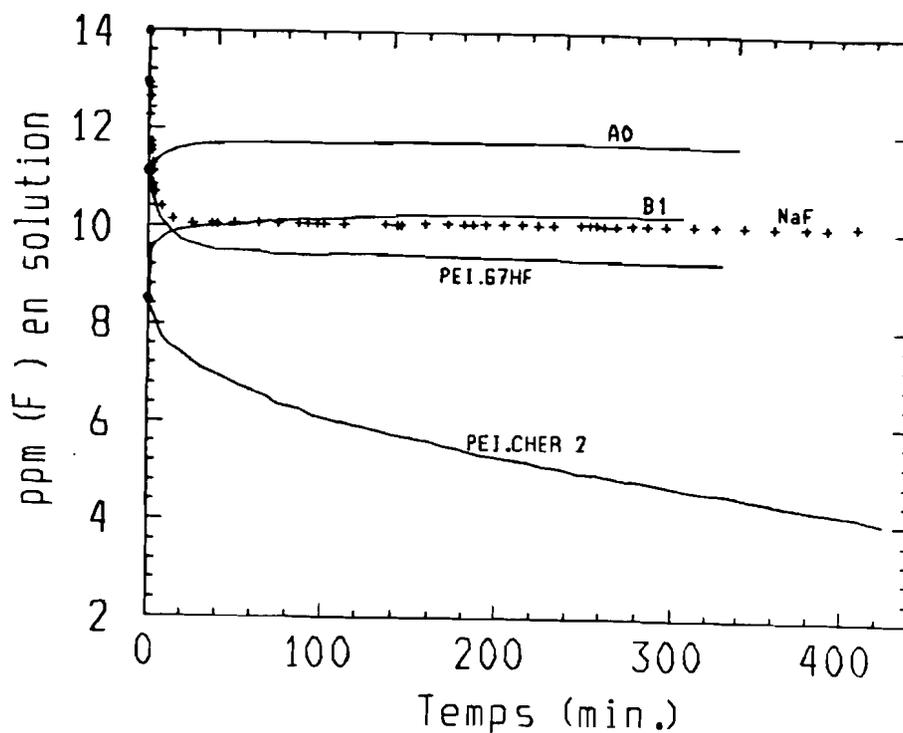


Figure V-1: Evolution des F^- en solution pendant la phase de dissolution ($t = 0$ à $t = 440$ minutes).

AO : F^- en solution en présence de PEI.G₇HF, sans apatite.

PEI.G₇HF: F^- en solution en présence de PEI.G₇HF + 10mg HAS.

B1 : F^- en solution en présence de PEI.CHER 2, sans apatite.

PEI.CHER 2: F^- en solution en présence de PEI.CHER 2 + 10mg HAS.

++ : F^- en solution à partir de NaF, en présence de 10 mg HAS.

Les ppm de F^- en solution au début de la phase de dissolution ($t = 0$) sont identiques à ceux de la fin de mise à l'équilibre (tableau V-4).

Les résultats obtenus pendant la phase de mise à l'équilibre (durée moyenne: 2 heures) à pH 7 sont résumés dans le tableau V-4.

	ppm F ⁻ initiaux	ppm F ⁻ fin équilibre	
		(-HAS)	(+HAS)
NaF	14	14	12,89
PEI.G ₇ HF	14	11,69	11,53
PEI.CHER2	14	8,77	8,31

Tableau V-4: Evolution des F⁻ dans le réacteur pendant la mise à l'équilibre (pH 7) en présence (+HAS) et en absence (-HAS) d'apatite.

En tenant compte de la quantité de poudre d'apatite utilisée (10mg) et de sa surface spécifique (45 m²/g), en présence de NaF, nous pouvons estimer la quantité de F⁻ adsorbée pendant cette période à 6,5x10⁻⁶ moles/m².

Pour les polymères, il apparaît déjà que tous les F⁻ ne passent pas en solution en présence ou absence d'apatite. Nous ne savons pas si les F⁻ non détectés par l'électrode sont directement adsorbés sur l'apatite ou alors ils restent couplés aux polymères.

Pendant la période de dissolution à pH 5, le comportement des F⁻ dans chaque cas est présenté (figure V-1)

En absence d'apatite, le passage de pH 7 (fin équilibre) à pH 5 (dissolution) montre une augmentation des F⁻ en solution en présence des polymères. Cette augmentation est plus importante dans l'expérience avec PEI.CHER 2 qui remet environ 1,23ppm de F⁻ en solution.

En présence d'apatite, la période de dissolution se caractérise par une diminution des F⁻ en solution, correspondant à une adsorption. Elle est très rapide en présence de NaF et PEI.G₇HF, lente mais de durée plus longue pour PEI.CHER 2. En fin d'expérience, l'adsorption est plus importante en présence de PEI.CHER 2 car partant de 8,31ppm au début de la phase de dissolution, on ne trouve plus que 4ppm en solution après cette période.

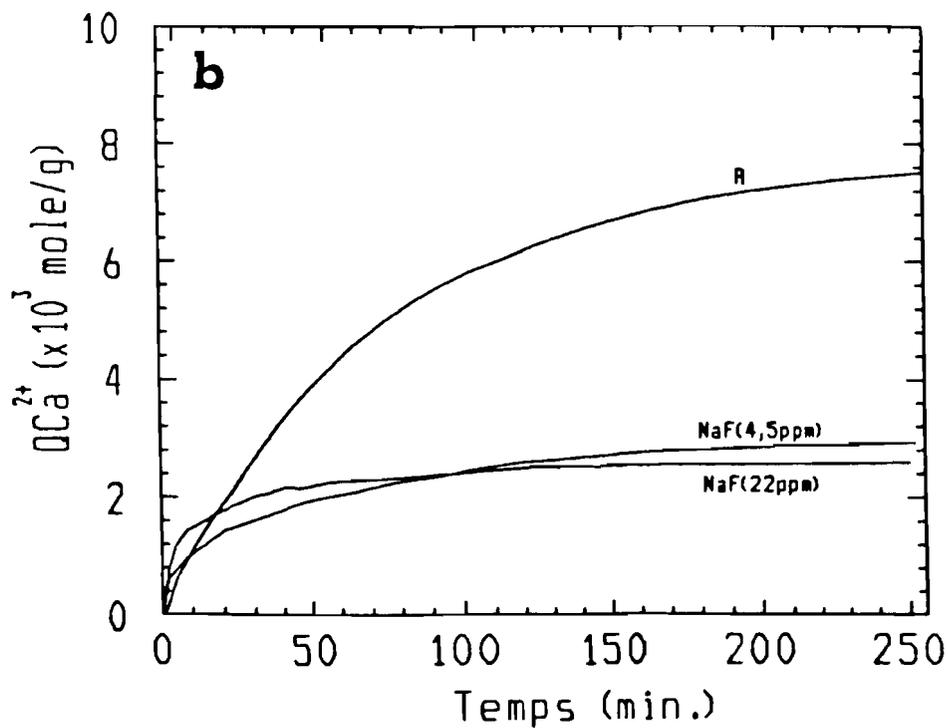
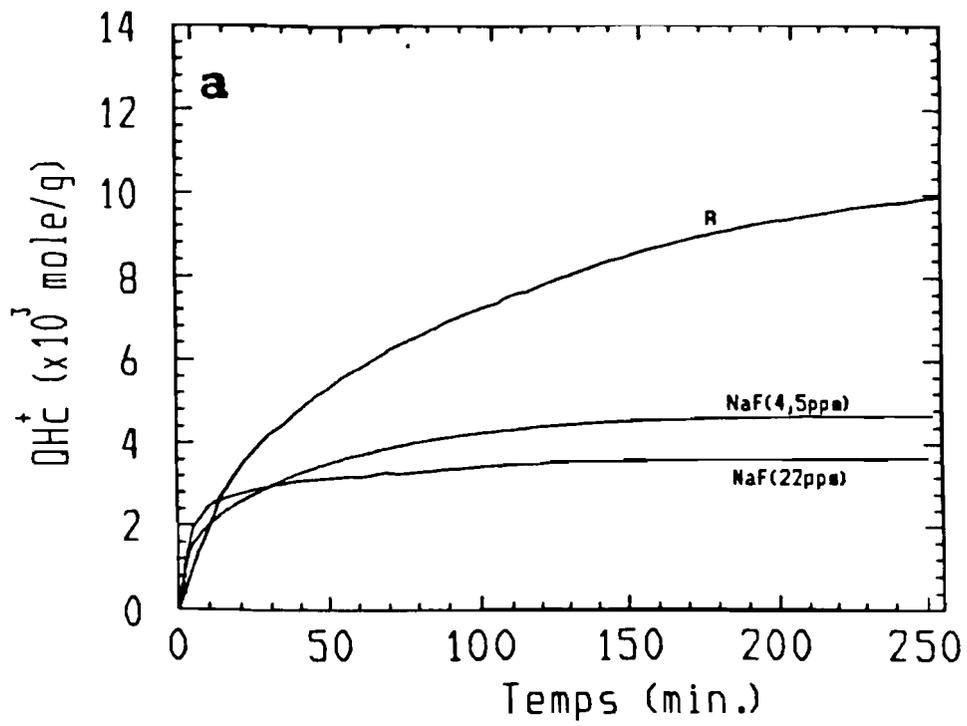


Figure V-2 (a,b): Effets de NaF (4,5ppm, 22ppm F-) sur la dissolution de 10mg HAS à pH 5. En (a): consommation des protons; en (b) libération du calcium.

Conclusion: Les polymères accentuent l'adsorption de F^- au cours de la dissolution de l'apatite. Les quantités de F^- en solution pendant la mise à l'équilibre et leur augmentation en absence d'apatite lors du changement de pH montrent bien que ces polymères peuvent être considérés comme des réservoirs des ions F^- , mobilisables en cas de changement de pH; ceci n'est pas envisageable avec NaF. Ces propriétés sont plus marquées pour la PEI.CHER 2.

Dans la suite de ce travail, nous avons évalué l'effet d'une solution d'ions fluorures seuls sur le processus de dissolution, comparé à l'effet résultant du couplage entre de tels ions et des polymères.

V-2.01. ACTION DU FLUORURE DE SODIUM SUR LA DISSOLUTION DE L'HYDROXYAPATITE

En étudiant l'inhibition de la dissolution par le fluorure de sodium (NaF), nous avons constaté que pendant les instants initiaux, le processus est accéléré par rapport à une cinétique de référence. Dans une étape ultérieure, la dissolution est totalement inhibée (figures V-2(a,b)). Une étude approfondie de cet effet est par ailleurs en cours dans notre laboratoire.

Cette accélération initiale paraît même d'autant plus importante que la concentration en fluorure est forte.

Il est possible d'interpréter cet effet initial d'accélération comme le résultat d'une désorption importante du calcium adsorbé à l'interface de l'apatite. Cette désorption réduit la perméabilité de la membrane vis à vis des ions calcium. Les ions fluorures en solution diminuent le produit de solubilité de l'apatite et permettent ainsi une atteinte plus rapide de l'équilibre, conduisant à l'arrêt de la dissolution. L'action des fluorures est donc bénéfique à long terme.

Sous un angle prophylactique, il serait important de pouvoir annihiler cette phase initiale d'accélération en présence des F^- . Nous avons montré précédemment que les polymères ne conduisaient pas à une accélération des cinétiques. L'objectif de l'étude à suivre consiste donc à analyser si les effets bénéfiques (à court terme) des polymères et des ions F^- (à long terme) sont additifs.

Grâce à l'analyse précédente (chap. IV.), nous sommes arrivés à sélectionner dans chaque groupe de polymères, un dérivé dont les capacités intrinsèques à inhiber le processus de dissolution sont significatives. Seuls ces dérivés seront étudiés dans cette partie du travail. Nous ne présenterons donc que les effets du couplage du F^- avec PEI

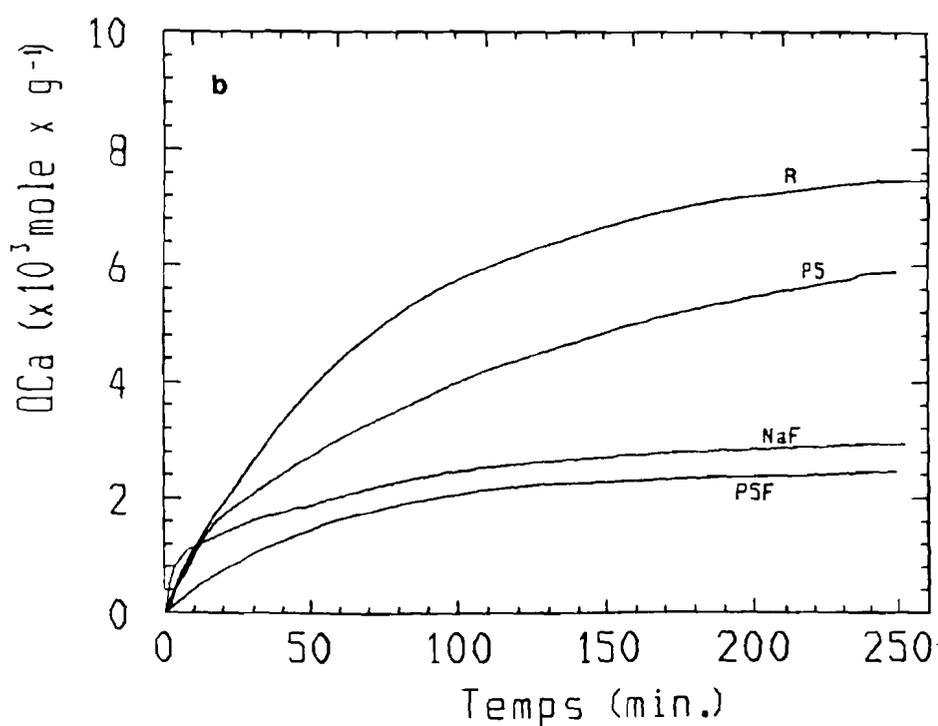
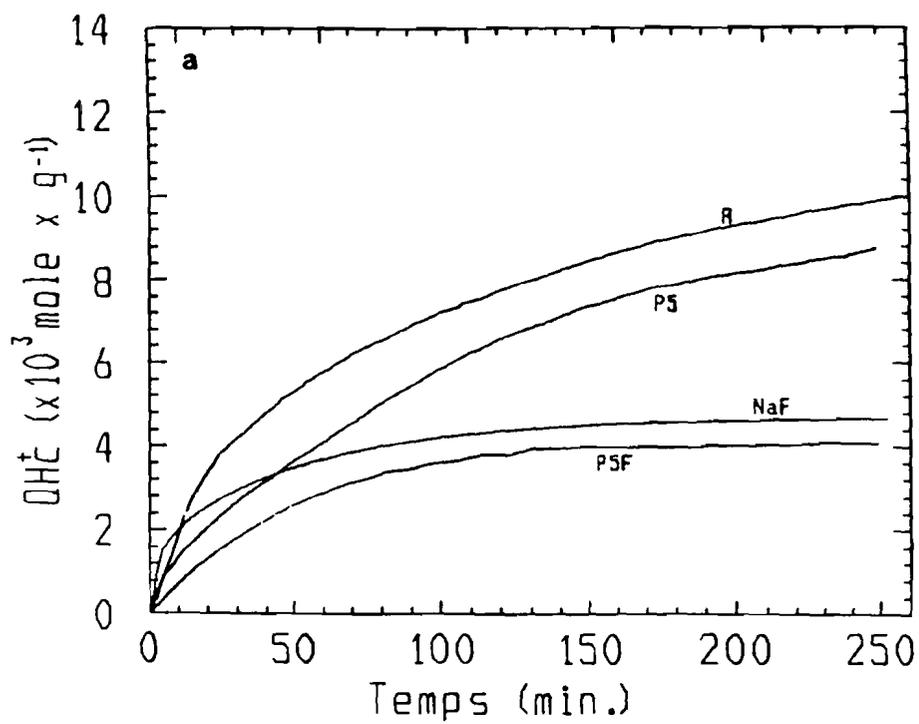


Figure V-3 (a,b): Effets du couplage PEI 500 - F $^-$ (P5F) sur les cinétiques de consommation de protons (a) et de libération du calcium (b); comparaison avec PEI 500 (P5) et NaF.

500, PEI.G₇ et PEI.CHER. La comparaison sera faite avec les cinétiques de dissolution en présence des solutions de NaF.

Il est à noter que tous les autres polymères synthétisés et couplés aux ions F⁻ ont été étudiés dans les mêmes conditions et ont donné des effets inhibiteurs importants. Mais le détails de ces résultats ne sera pas présenté.

V-2.A EFFETS DU COUPLAGE PEI LINEAIRES – FLUORURES

La PEI 500HCl est le polymère de base qui conduit à l'inhibition la plus importante parmi les dérivés ayant la même structure. Il nous a paru intéressant dans ce cas d'étudier les effets de son couplage avec les ions fluorures.

La solution de PEI 500HF est préparée selon le même protocole que les polymères de base et l'évolution des F⁻ en solution est suivie par une électrode spécifique (voir Chap. III). Selon les données de l'analyse élémentaire, nous avons maintenu la concentration d'essai initiale à 0,005g%(m/v). La quantité de F⁻ associée au polymère à cette concentration est de 4,2ppm. La quantité de F⁻ utilisée dans la solution de NaF est de 4,5ppm. Les cinétiques de référence et celles des polymères seuls servant de base de comparaison dans le présent chapitre sont celles du chapitre précédent.

V-2.A.1 Consommation de protons et libération de calcium

Les cinétiques (figures V-3(a,b)) montrent que la dissolution est fortement inhibée en présence de PEI 500HF. L'effet résultant du couplage est plus important que les effets individuels des constituants de ce polymère, et l'on observe surtout une absence totale d'accélération initiale, contrairement aux cinétiques en présence de NaF. Le couplage ainsi que NaF seul conduisent à un arrêt total du processus de dissolution, avec une activité à saturation du calcium bien faible. Les effets inhibiteurs de la PEI 500HF et NaF sont présentés dans le tableau V-5.

	Ref		PEI 500		PEI 500HF		NaF	
Ions de base	H ⁺	Ca ²⁺						
%Dissolution	71	71	63	59	29	25	34	29

Tableau V-5: Taux de dissolution obtenus en présence des polymères indiqués, à la concentration de 0,005g% (m/v). Les quantités de F⁻ sont respectivement de 4,2ppm (PEI 500HF) et 4,5ppm (NaF).

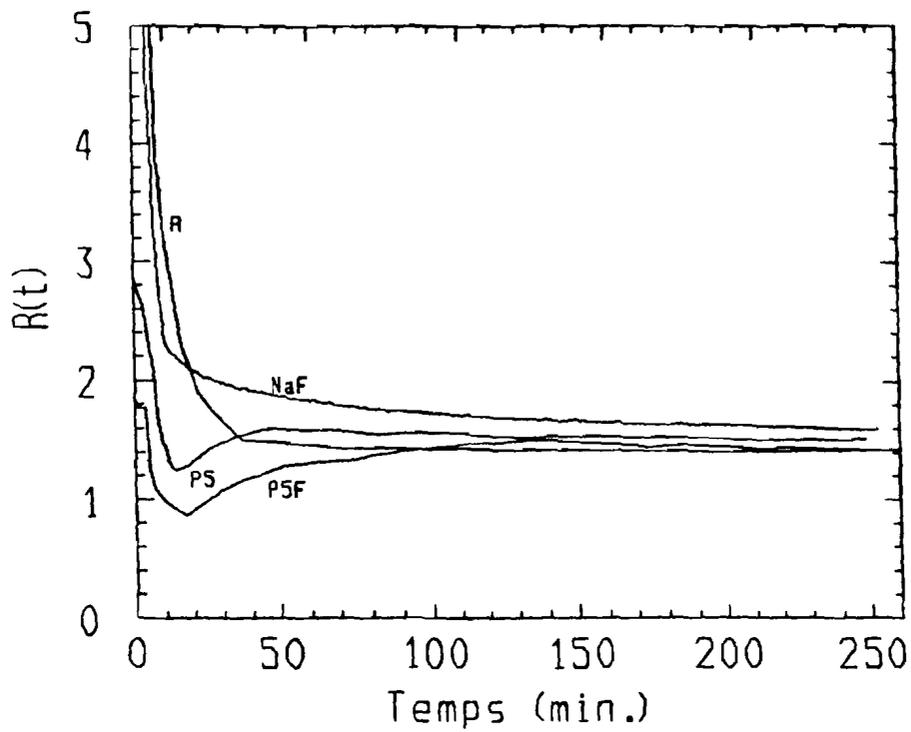


Figure V-4: Evolution en fonction du temps du rapport de congruence en présence de PEI 500HF (P5F), comparée à NaF et PEI 500 (P5).

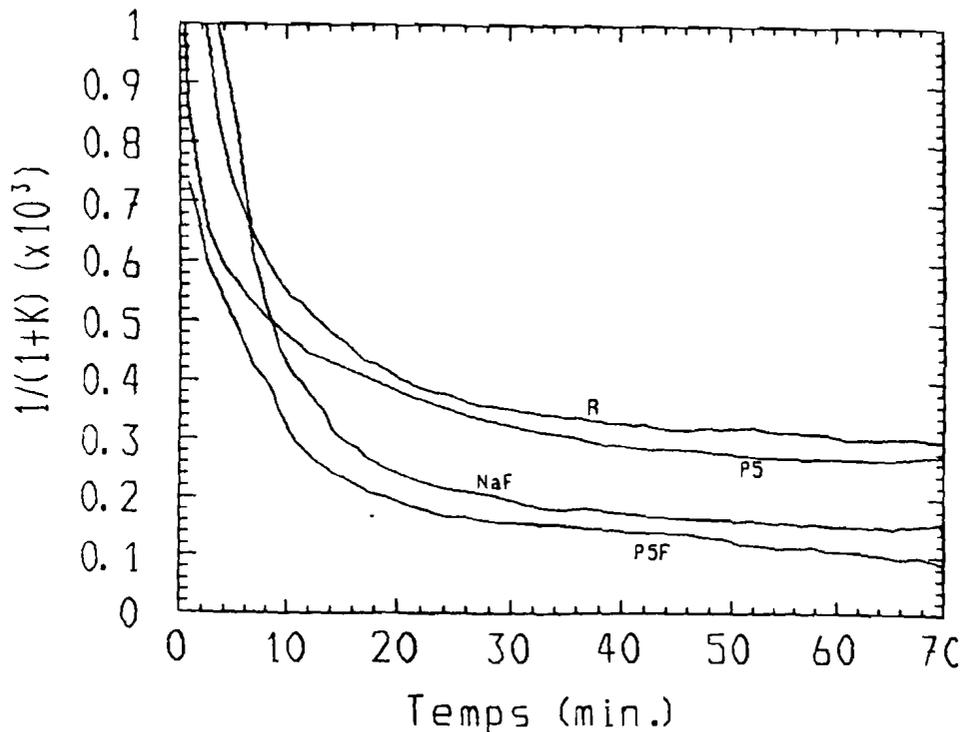


Figure V-5: Influence de PEI 500HF (P5F) sur l'évolution du facteur $1/(1+K)$, par rapport à NaF et PEI 500 (P5).

V-2.A.2. Le rapport de congruence

L'évolution en fonction du temps des rapports de congruence est présentée sur la figure V-4

L'évolution générale $R(t)$ pour la PEI 500HF est semblable à celle de la PEI 500 et à la fin de la période de dissolution, les valeurs de $R(t)$ pour les deux familles de polymères sont identiques et très proches de la valeur de congruence.

V-2.A.3. Quantification de l'inhibition

Contrairement aux cinétiques de dissolution réalisées avec le polymère seul, le couplage polymère-fluorure permet d'atteindre un état d'équilibre pendant la période expérimentale. De plus, la dissolution, compte tenu de l'évolution de $R(t)$ est quasiment congruente à la fin de l'expérience.

L'activité du calcium dans le réacteur à la fin de l'expérience en présence de la PEI 500HF, est de $5,572 \times 10^{-4}M$, alors qu'elle est de $5,698 \times 10^{-4}M$ en présence de NaF. Pour le calcul de $1/(1+K)$ en fonction du temps (figure V-5), nous considérons l'activité à saturation obtenue en présence de NaF, car nous avons supposé précédemment que le polymère seul ne modifie pas le produit de solubilité de l'apatite. Cette considération est valable pour la suite de l'étude.

On remarquera que malgré la présence des quantités équivalentes de F^- dans les deux types d'expériences, une activité du calcium bien plus faible est atteinte en présence du polymère, montrant bien qu'il y a synergie d'action entre le polymère et F^- .

On retrouve dans ces courbes la phase d'accélération des cinétiques observée en présence de NaF. Ainsi, après 5 minutes de dissolution, les valeurs de K pour la référence et NaF sont respectivement les suivantes: $1,372 \times 10^3$ et $1,189 \times 10^3$. En considérant le seuil de 30% de dissolution pour la référence les valeurs de K déterminés en considérant les activités ioniques expérimentales du calcium, pour chacun des polymères et NaF sont données dans le tableau V-6.

	Ref	PEI 500	PEI 500HF	NaF	t(min)
K (x 10 ³)	1,835	2,083	3,003	2,278	10
	2,940	3,003	6,135	4,975	30

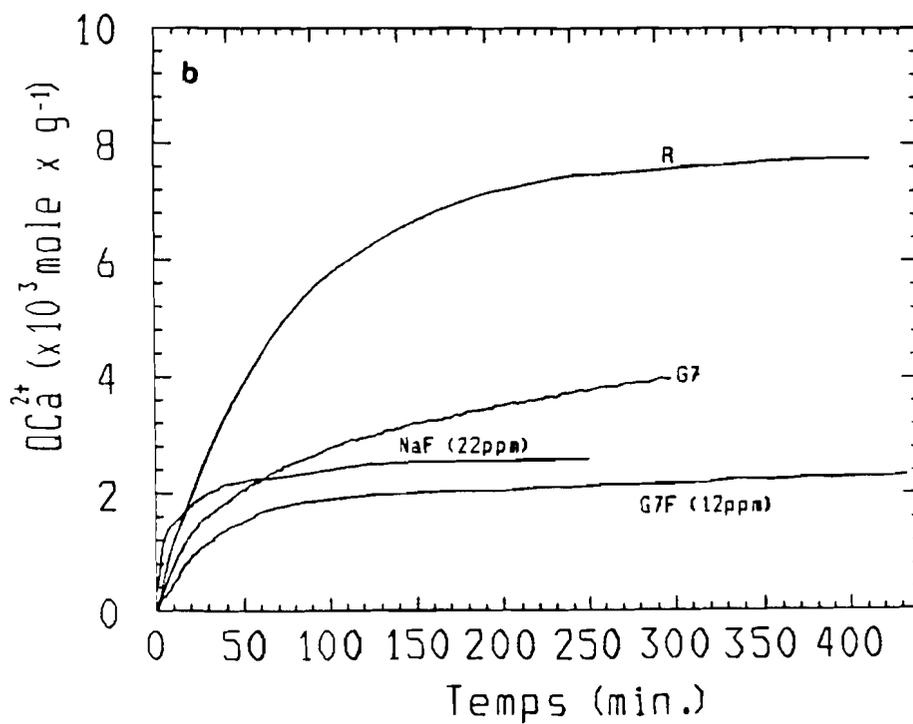
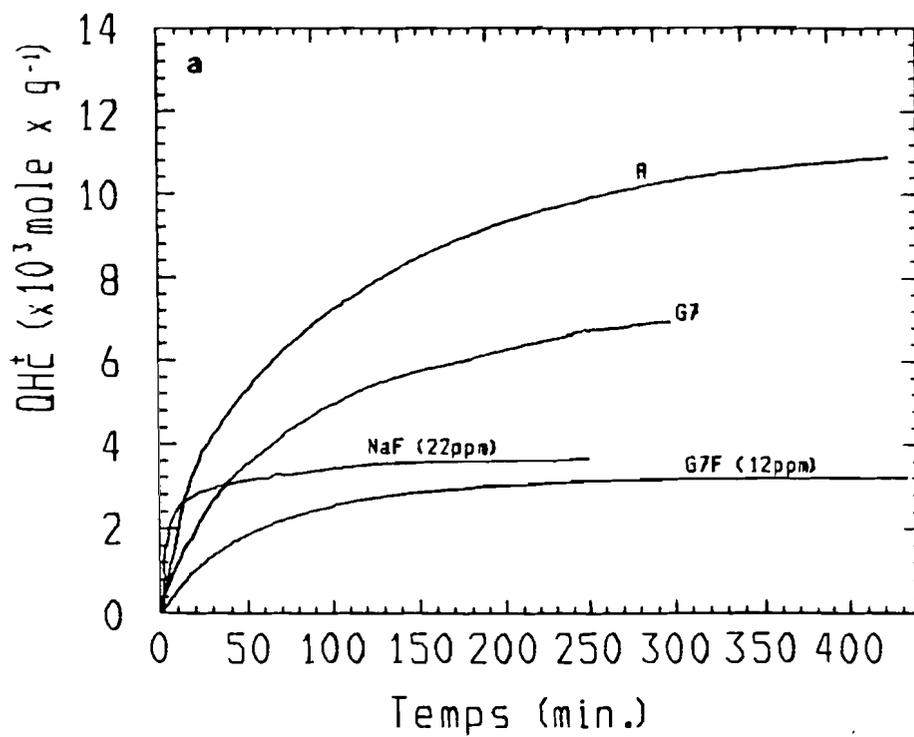


Figure V-6 (a,b): Cinétiques de consommation des protons (a) et libération du calcium (b) en présence de PEI.G₇HF (G7F) [12pp F-], comparées à 22ppm F- (NaF), PEI.G₇ (G7) et une référence.

V-2.A.4. Conclusion

Les capacités inhibitrices de la PEI 500 couplée aux ions F^- sont supérieures à celles de ce polymère seul, ainsi qu'à celles d'une solution de NaF contenant la même quantité de F^- . Ce couplage élimine la phase d'accélération initiale induite par le fluorure seul, et permet donc d'atteindre une inhibition importante sur l'ensemble de la période expérimentale.

V-2.B EFFETS DU COUPLAGE PEI ALKYLEES- FLUORURES

Dans la série des polymères alkylés, le dérivé ayant induit l'inhibition la plus significative est PEI.G₇. Cette raison nous a conduit à considérer sa forme fluorhydrate (PEI.G₇HF) pour l'étude des effets de couplage entre les PEI alkylées et les ions fluorures. La concentration du polymère dans le réacteur est de 0,005g%. Les données de l'analyse élémentaire ont montré que le polymère à cette concentration est couplé à 12ppm de F^- . Dans le but d'analyser les effets quantitatifs, nous avons choisi de comparer l'action de la PEI.G₇HF à celle d'une concentration plus importante de F^- ; une concentration de 22ppm a été retenue, sachant que l'effet sur la dissolution de 12ppm (NaF) est inférieur.

IV-2.B.1. Consommation des protons et libération du calcium

Les figures V-6 (a,b), représentent les variations de la consommation des protons et de libération du calcium en fonction du temps.

Comme dans le cas de la PEI 500HF, le couplage accentue considérablement l'action du polymère seul. En présence de PEI.G₇HF et après 440 minutes d'expérience, le taux de dissolution atteint à peine 23%, qu'il soit évalué à partir de la consommation des protons ou la libération de calcium, alors que la PEI.G₇ avait conduit à des taux respectifs de 49% et 40%.

En présence de 22ppm de F^- apportés sous forme de NaF, la dissolution atteint 26% par rapport au calcium et aux protons.

Comme nous l'avons observé pour PEI 500HF, PEI.G₇HF contrairement à NaF ne provoque pas d'accélération de la dissolution dans les instants initiaux.

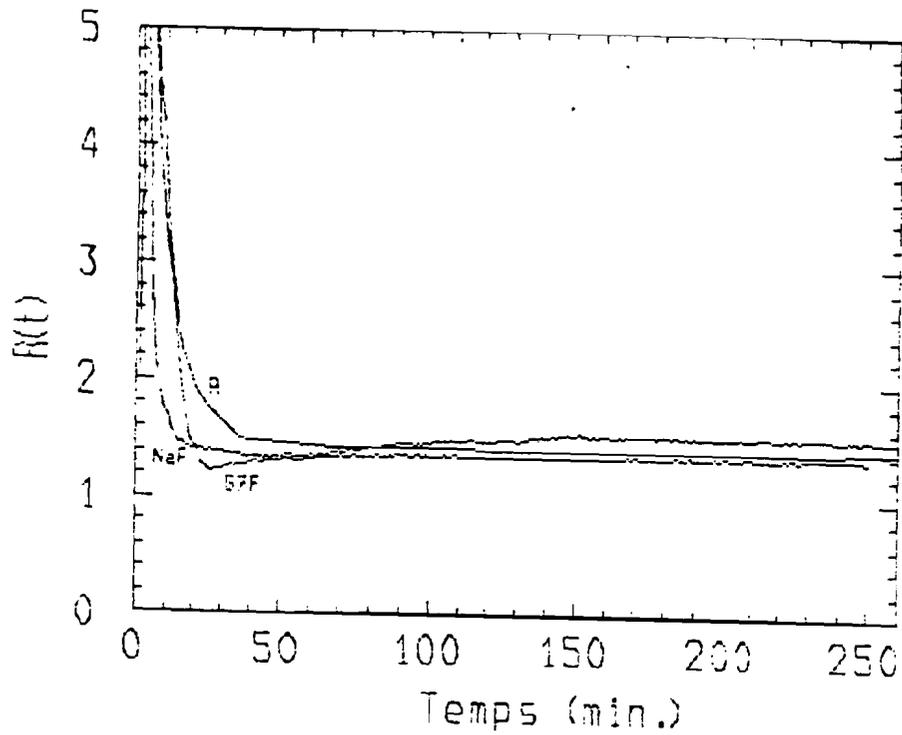


Figure V-7: Effets du couplage PEI G₇HF (G7F) sur l'évolution du rapport de congruence, comparés à NaF et une référence (R).

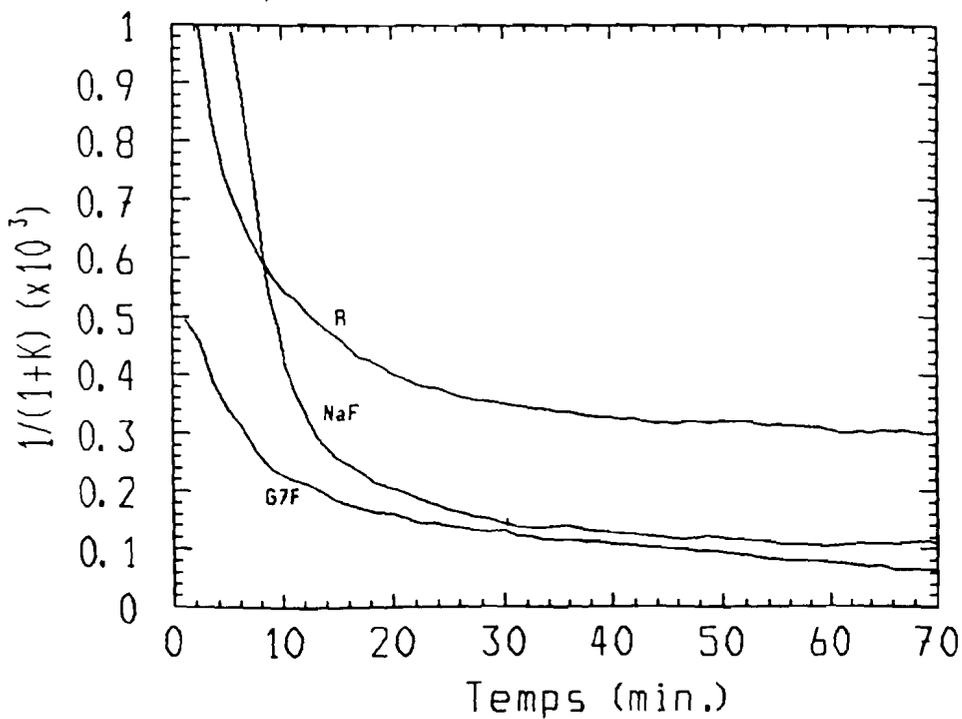


Figure V-8: Influence de PEI.G₇HF (G7F) sur l'évolution du facteur $1/(1+K)$, en fonction du temps.

V-2.B.2. Le rapport de congruence

La figure V-7 présente l'évolution du rapport de congruence en fonction du temps.

Pour PEI.G₇HF et NaF, la phase d'accumulation du calcium en début de dissolution est très rapide par rapport à la cinétique de référence et l'allure générale est comparable à celle précédemment observée pour la PEI.G₇. Malgré des valeurs proches de la congruence théorique, on note pourtant aux temps longs une accumulation supplémentaire de calcium dans le système polymère/F⁻, confirmant ainsi la non congruence de la dissolution observée avec le polymère seul.

V-2.B.3. Quantification de l'inhibition

A la fin de l'expérience, l'activité du calcium dans le réacteur est de $3,774 \times 10^{-4} \text{M}$ en présence de PEI.G₇HF, inférieure à celle trouvée en présence de NaF 22ppm ($4,4558 \times 10^{-4} \text{M}$). Nous avons montré qu'en présence de 4,5ppm de F⁻, l'activité à saturation était de $5,698 \times 10^{-4} \text{M}$. Les résultats atteints expérimentalement en présence de NaF concordent tout à fait avec ceux obtenus par Gasser (communication privée). Pour la détermination de K, nous considérons l'activité à saturation en présence de 22ppm F⁻ sous forme de NaF

L'analyse quantitative de l'inhibition a été réalisée par l'étude de l'évolution du rapport $1/(1+K)$ en fonction du temps (figure V-8).

Comme nous l'avons déjà observé au niveau des cinétiques de dissolution, NaF a un effet accélérateur en début de dissolution, alors que le polymère couplé à F⁻ conduit immédiatement à une inhibition importante. Après environ 30 minutes de dissolution les valeurs de $1/(1+K)$ en présence de NaF sont comparables à celles de PEI.G₇HF.

V-2.B.4 Conclusion

Le couplage PEI.G₇ fluorure renforce l'action du polymère seul et inhibe nettement mieux qu'une solution de F⁻ deux fois plus concentrée. Son action comporte trois aspects complémentaires:

- conservation de la propriété d'inhibition initiale rapide liée à l'adsorption du polymère;
- forte réduction de l'activité à saturation en raison de la présence des ions F⁻ dans la solution;
- accumulation supplémentaire de calcium compensée par une libération non congruente de phosphate.

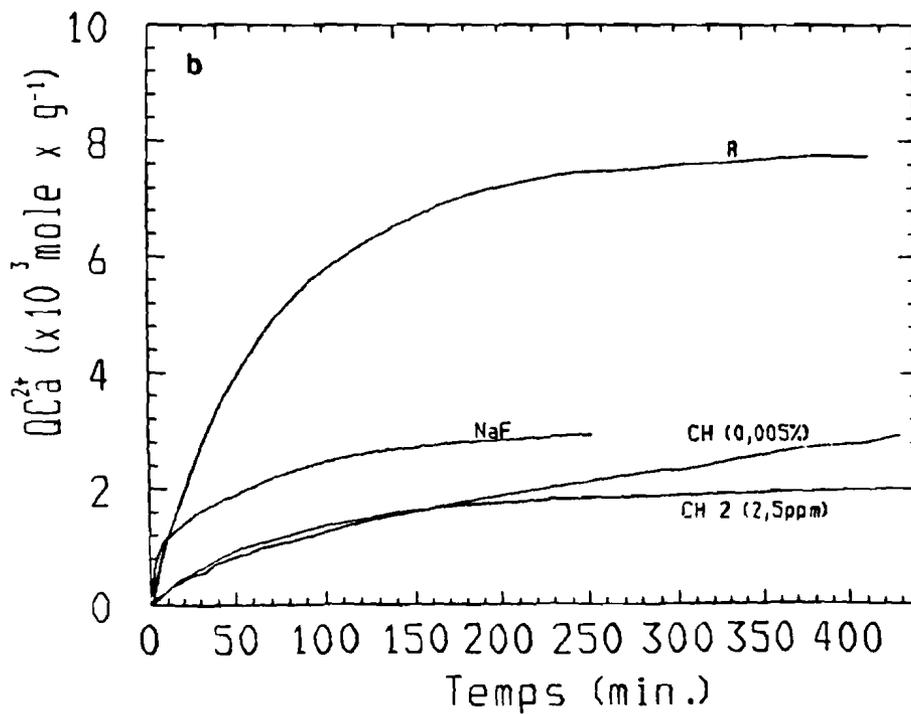
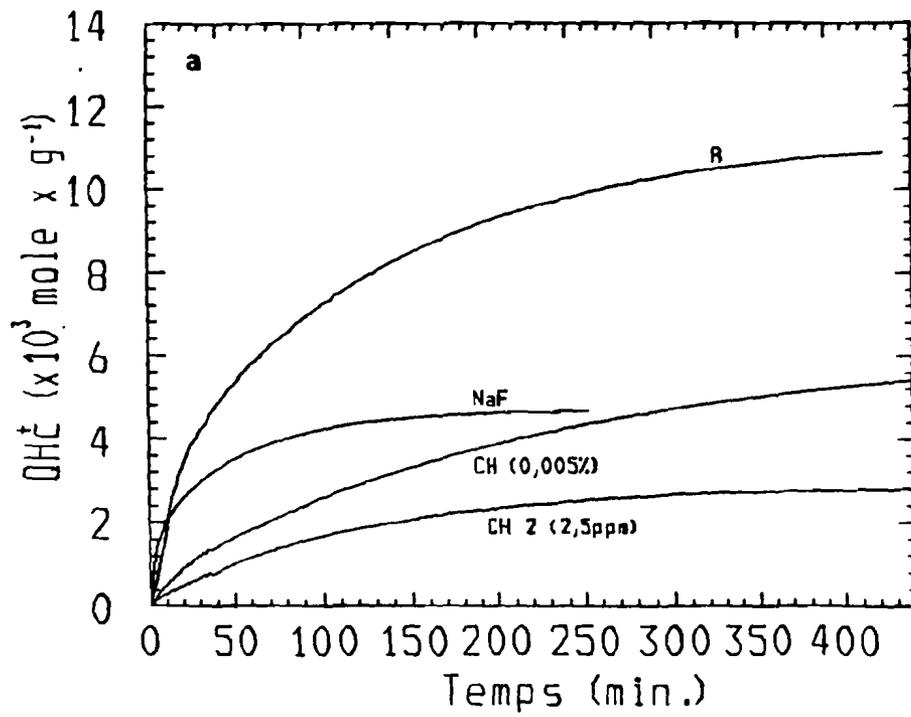


Figure V-9 (a,b): Effets de PEI.CHER 2 (couplé à 2,5ppm F $^-$) sur les cinétiques de consommation des protons (a) et de libération du calcium (b), comparés à NaF (4,5ppm F $^-$) et une référence (R).

V-2.C. EFFETS DU COUPLAGE PEI DE STRUCTURE HETEROGENE-FLUORURES

Nous avons montré précédemment que les PEI de structure hétérogène possédaient les capacités inhibitrices intrinsèques les plus importantes, amplifiées avec l'augmentation de la concentration.

Le couplage du polymère PEI.CHER 1 aux anions F^- peut renforcer son aptitude à inhiber la dissolution. Un tel couplage nous a permis de synthétiser le dérivé nommé PEI.CHER 2 testé dans cette étude.

Le dérivé de structure hétérogène comportant notamment des groupements carboxyliques et couplé également aux F^- (PEI.MOR 2) donne aussi une inhibition importante; mais son action ne sera pas présentée car elle est inférieure à celle de PEI.CHER 2.

PEI.CHER 2 est obtenu par substitution de Br^- par F^- au niveau des sites quaternaires de PEI.CHER 1. La proportion de F^- associée au polymère est donnée au chapitre II. Pour rester homogène par rapport à nos conditions expérimentales, nous avons initié l'étude des effets de couplage en utilisant une concentration de 0,005g% (m/v) de polymère, teneur qui, en se basant sur les données de l'analyse élémentaire, associe à la macromolécule 2,5ppm de F^- .

Les effets obtenus seront comparés à ceux donnés par une concentration équivalente de PEI.CHER 1 et une solution de NaF contenant 4,5ppm de F^- . Nous analyserons dans un second temps l'effet d'une concentration double en polymère, correspondant à un couplage avec 5ppm de F^- .

V.2.C.1. Consommation des protons et libération du calcium

Les cinétiques de consommation des protons et de libération du calcium sont données (figures V-9 (a, b))

La cinétique de consommation des protons en présence de PEI.CHER 2 est bien plus faible que celle en présence de NaF (4,5ppm F^-) ou de PEI.CHER 1 (0,005%). A l'équilibre, le taux de conversion de l'apatite estimé à partir de la consommation des protons, en présence de la PEI.CHER 2, est d'environ 20%, alors qu'il est de 34% en présence de NaF (4,5ppm) et de 39% pour PEI.CHER1.

Contrairement à NaF, PEI.CHER 2 ne provoque aucune accélération des cinétiques de consommation des protons et de libération du calcium. La partie organique contrôlerait alors la réactivité de F^- .

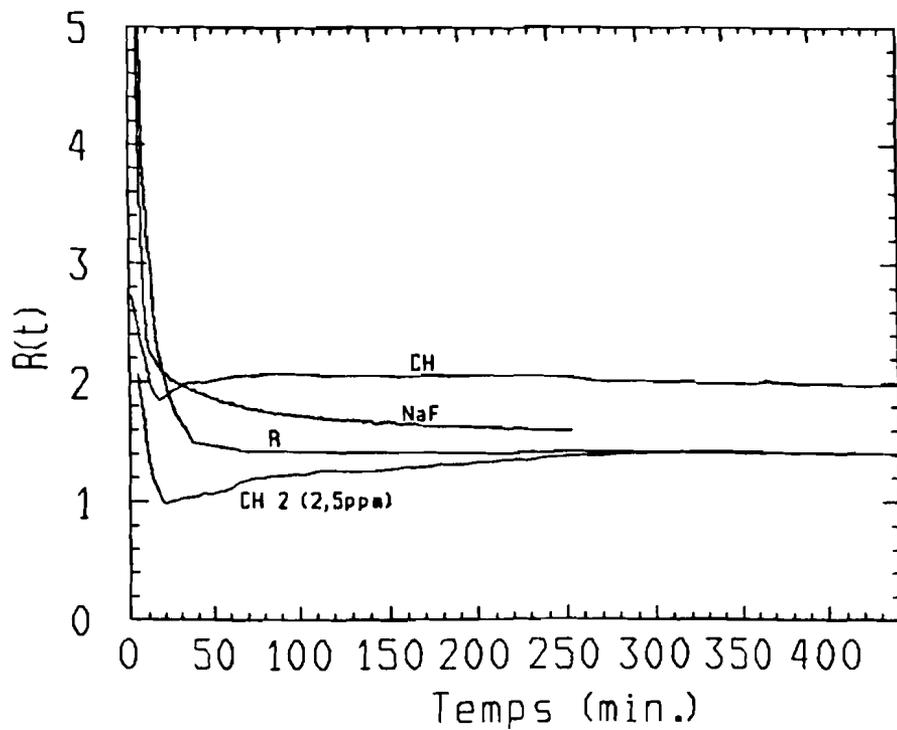


Figure V-10: Evolution du rapport de congruence en présence de PEI.CHER 2 (CH 2), comparée à NaF (4,5ppm F⁻), PEI.CHER 1 (CH).

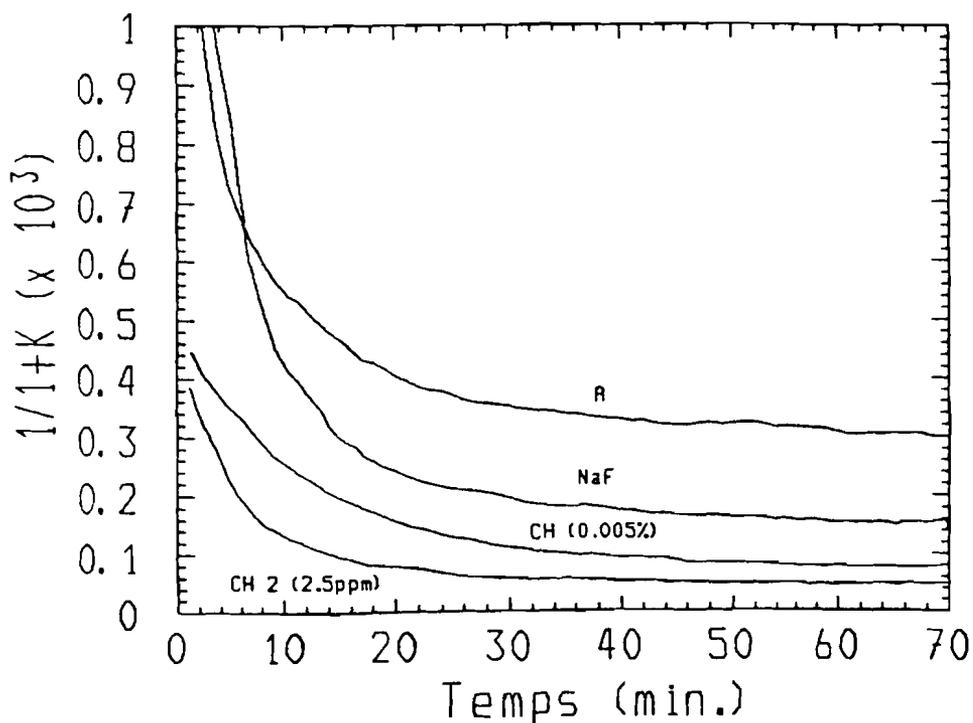


Figure V-11: Influence de PEI.CHER 2 (CH 2) sur l'évolution du facteur $1/(1+K)$, par rapport à PEI.CHER 1 (CH) et NaF (4,5ppm F⁻)

V.2 .C.2. Le rapport de congruence

L'évolution du rapport de congruence (figure V-10) montre une forte diminution de $R(t)$ durant les instants initiaux de la dissolution suivie d'une lente remontée pour tendre finalement vers la valeur théorique.

Le comportement est tout à fait différent de celui du polymère seul qui s'était caractérisé par une forte accumulation du calcium supplémentaire.

V.2.C.3. Quantification de l'inhibition par la PEI.CHER 2

La quantification de l'inhibition par l'étude de l'évolution du rapport $1/(1+K)$ (figure V-11) de PEI.CHER 2 et NaF atteste bien de l'accentuation de l'inhibition induite par le couplage polymère – fluorure.

Les cinétiques de dissolution sont totalement stoppées par l'atteinte d'un équilibre thermodynamique et la valeur de l'activité du calcium en solution à la fin de l'expérience est $3,556 \times 10^{-4} M$.

Si nous analysons ponctuellement la capacité inhibitrice de PEI.CHER 2 en considérant l'activité à saturation obtenue avec 4,5ppm F⁻ ($5,698 \times 10^{-4} M$) comparée à la cinétique de référence, NaF et la PEI.CHER 1 après 35 minutes de dissolution, nous atteignons les valeurs de K suivantes (tableau V-7):

	Ref	NaF	PEI.CHER 1	PEI.CHER 2
Concentration	0	4,5ppm F	0,005%	0,005%(2,5ppmF)
K	$2,5 \times 10^3$	4×10^3	8×10^3	12×10^3

Tableau V-7: Valeurs de K déterminées après 35 minutes de dissolution de 10mg de HAS en présence des polymères indiqués et NaF.

Par ces valeurs de K, il ressort que le couple polymère-fluorures (PEI.CHER 2 à (2,5ppm F)) possède une capacité d'inhibition 3 fois plus importante que NaF seul à 4,5ppm F, et environ 1,7 fois plus importante que NaF (22ppm F) (voir V.2.B.).

V.2.C.4. Effets de concentration de la PEI.CHER 2.

Dans une étape supplémentaire, nous avons voulu évaluer l'effet de la concentration de PEI.CHER 2 sur le processus de dissolution.

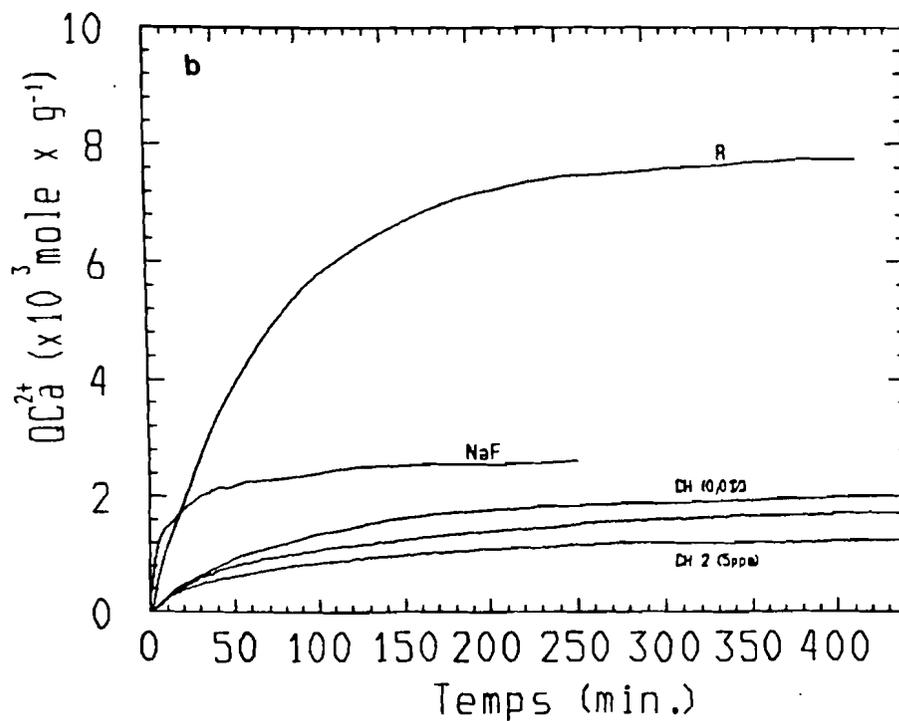
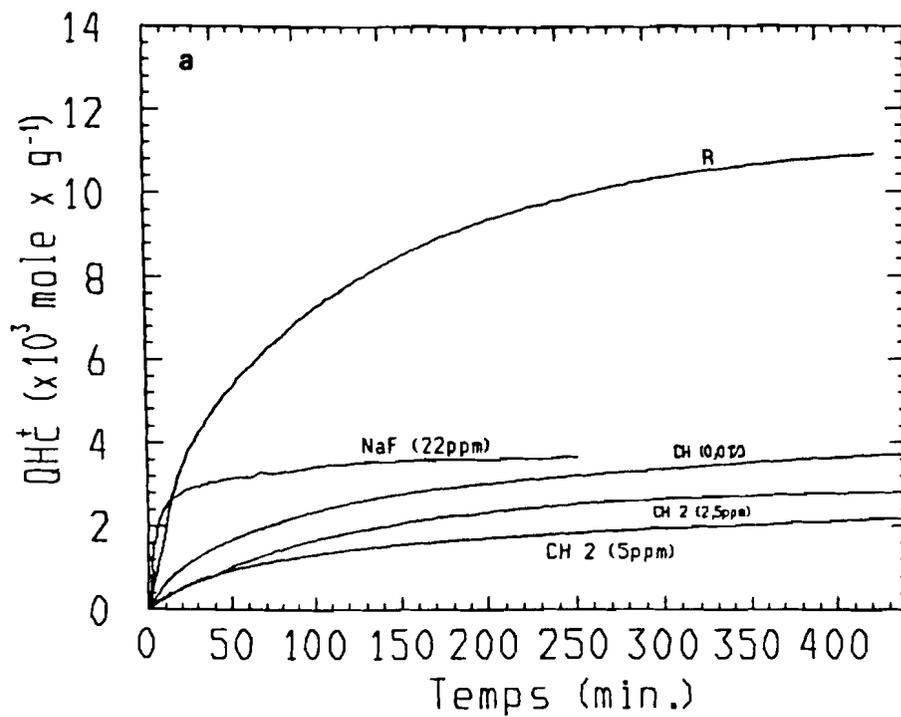


Figure V-12 (a,b): Influence de l'augmentation de la concentration de PEI.CHER 2 sur les cinétiques de consommation des protons (a) et de libération du calcium; comparaison avec NaF (22ppm F-) et PEI.CHER 1 concentrée à 0,01g%.

*** Consommation des protons et libération du calcium**

Lorsque la concentration de PEI.CHER 2 passe de 0,005g% (m/v) à 0,01g% (m/v) correspondant à un couplage avec 5ppm de fluorure, l'inhibition est accentuée. Les cinétiques de consommation des protons et de libération du calcium en présence de 0,01g% (m/v) de PEI.CHER 2 sont présentées sur les figures V-12(a,b).

Le taux de dissolution après un peu plus de 7 heures d'expérience est d'environ 16% en considérant la consommation des protons, alors que basé sur la libération de calcium, ce taux n'est plus que d'environ 13%.

Ce résultat indique qu'une augmentation de la concentration en polymère couplé aux ions F^- conduit à une plus forte inhibition et à une diminution de l'activité à saturation du calcium en solution.

*** Le rapport de congruence**

La variation de $R(t)$ (figure V-13) est assez comparable à celle correspondant à une cinétique de référence, alors que les taux de dissolution sont très différents. Ce résultat montre bien que la présence du polymère et en particulier les ions F^- en solution change la solubilité de l'apatite.

*** Quantification de l'inhibition**

La caractérisation de l'inhibition du processus de dissolution par PEI.CHER 2 0,01g% (m/v) (5ppm F^-) peut également se faire par l'étude du rapport $1/(1+K)$ en fonction du temps à la figure V-14.

L'activité du calcium dans le réacteur à la fin de la dissolution et correspondant à l'atteinte de l'équilibre est de $2,298 \times 10^{-4} M$. Le comportement cinétique confirme les différences déjà évoquées en comparant les courbes expérimentales en présence de NaF et du polymère couplé au F^- . Il y a donc une inhibition très forte aux instants initiaux (effet du polymère) et une importante réduction de la solubilité aux temps longs résultant de la présence des ions F^- .

V-2.C.5 Conclusion

Lorsque le fluorure est couplé au polymère PEI.CHER, il n'y a pas d'effet d'accélération aux instants initiaux, même quand la quantité de F^- associée augmente; la dissolution est fortement inhibée immédiatement. L'inhibition induite par le polymère à forte concentration (0,01g% soit 5ppm F^-) est beaucoup plus importante que celle due à une solution de NaF contenant 4 fois plus de fluorure. Même en comparant l'effet de

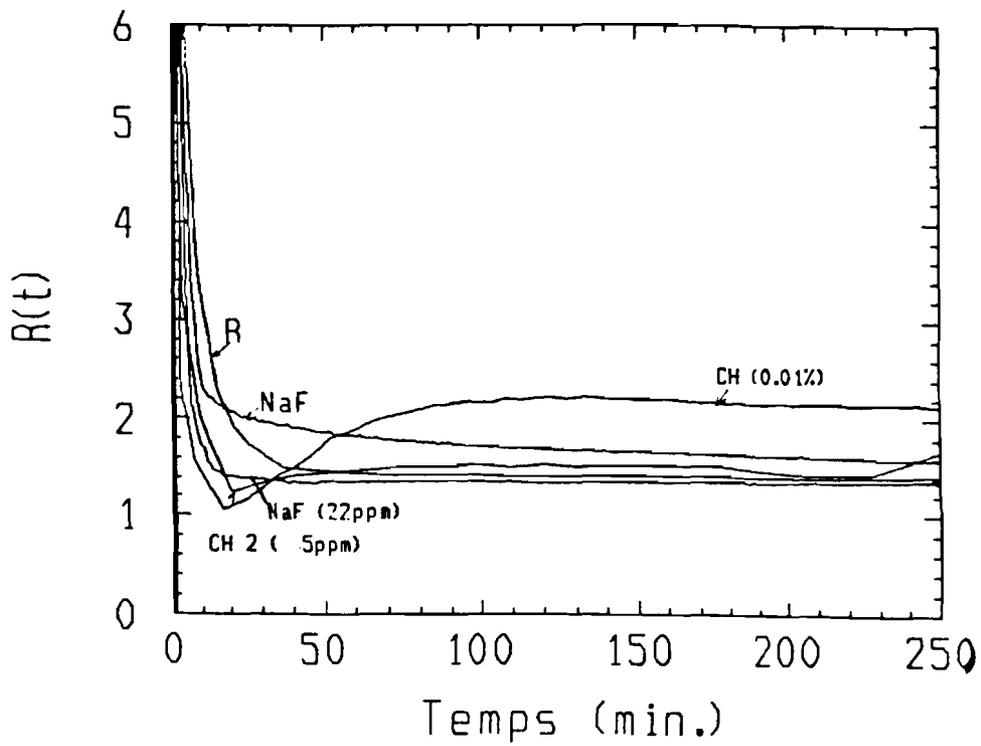


Figure V-13: Effets de la concentration de PEI.CHER 2 sur l'évolution du rapport de congruence en fonction du temps.

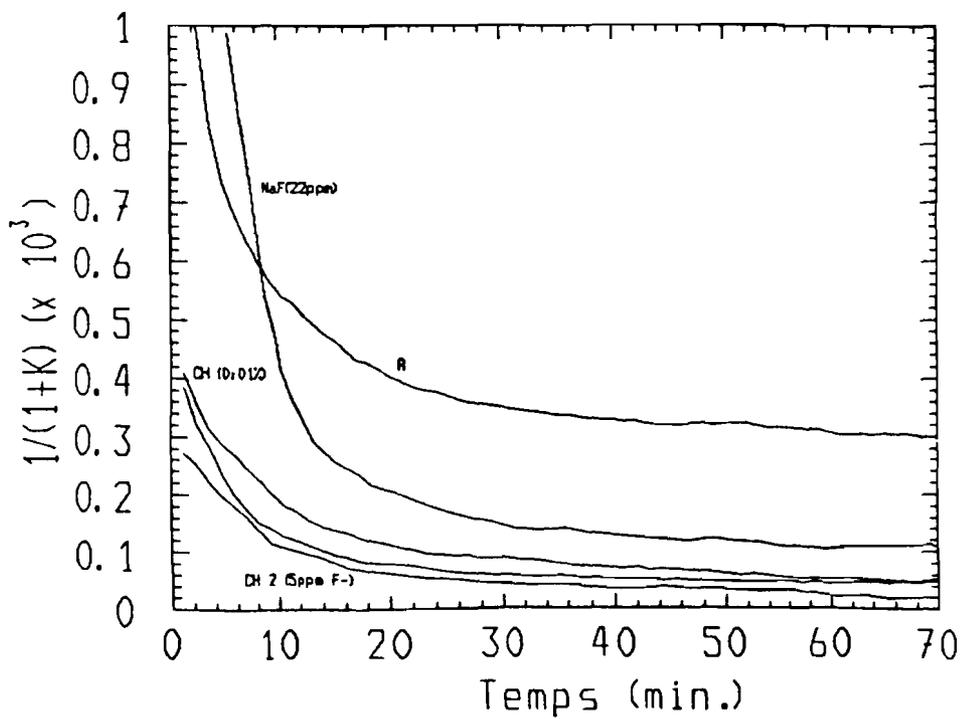


Figure V-14: Variations du facteur $1/(1+K)$ en présence des concentrations croissantes de PEI.CHER 2.

NaF (22ppm) à celui de la PEI.CHER 1 (0,01g%) (sans fluorure), le polymère semble conduire à une inhibition plus forte, montrant que les polymères de synthèse sont des agents efficaces pour l'inhibition de la dissolution de l'hydroxyapatite.

V-2.D. DISCUSSION

Les cinétiques de dissolution de l'hydroxyapatite en présence de PEI.CHER 2 montrent incontestablement que ce polymère inhibe fortement la dissolution. L'inhibition est d'autant plus importante que la concentration est élevée. Etant donné que cette action résulte d'une coopération entre le polymère et les ions fluorures, on peut se poser la question de savoir quel est le mécanisme d'action de ce polymère. Cette question se pose d'ailleurs pour l'ensemble des polymères couplés aux F^- dont les effets ont été jusqu'à présent testés. Ce mécanisme d'action peut s'expliquer à partir des cinétiques de consommation des protons et de libération de calcium. On peut ainsi distinguer deux phases dans le processus de dissolution et son inhibition par PEI.CHER 2.

– Une phase initiale où il apparaît d'emblée un net ralentissement des cinétiques, avec suppression totale de la phase d'accélération induite par le fluorure seul. Les cinétiques se rapprochent significativement de celles obtenues avec le polymère seul et s'en écartent plus tard. Cette évolution est nettement marquée pour la libération de calcium.

Nous pensons donc que dans cette première phase, l'action inhibitrice de la partie organique (polymère) est majoritaire, avec une contribution moins grande des fluorures. Le polymère semble donc contrôler les réactions du F^- avec le calcium adsorbé dans les instants initiaux de la dissolution.

– Une phase d'arrêt environ 3 heures après le début de la dissolution, caractérisée par un blocage total des cinétiques. En absence des fluorures, la cinétique se poursuivrait comme on le voit sur les graphes. Cet arrêt serait potentialisé par les fluorures dont l'adsorption sur la surface de l'apatite a été favorisée et activée par la présence du polymère. Nous ne pouvons pas préciser dans ce cas les quantités de fluorures adsorbées étant donné que nous ne connaissons pas la cinétique d'adsorption de la PEI.CHER. Mais vu la très forte inhibition obtenue, il est indiscutable que cette adsorption soit importante par rapport à la masse d'hydroxyapatite utilisée dans nos expériences. Une telle adsorption n'est pas impossible, car *Bartels et coll.* (1979) ont montré que les fluorures véhiculés par des dérivés organiques comme le polyvinylpyridinium s'adsorbent fortement sur l'apatite. Un résultat identique avait déjà été obtenu par *Mühlemann et coll.* (1957) ainsi que *Marthaler* (1968). Il est cependant important de noter que dans chacun de ces exemples, le support organique est différent.

Tous ces supports sont encore plus différents des PEI, et plus particulièrement la PEI.CHER 2.

Cette action biphasique résulte donc des propriétés de la PEI.CHER, en relation avec la dissolution et sa structure.

1 – PEI.CHER 2 possède de par son dérivé de base PEI.CHER 1 une capacité inhibitrice intrinsèque incontestable qui satisfait pleinement aux caractéristiques d'un inhibiteur idéal;

2 – PEI.CHER 2 est un échangeur d'ions qui, dans notre mode de synthèse, a une capacité de 2,8 moles/g soit 2,8mEq/g. Cette capacité traduit simplement la quantité d'anions que l'échangeur peut fournir. Une telle molécule est donc un réservoir de contre-ions échangeables (*Helferich*, 1962). Cette caractéristique de réservoir pour les polymères étudiés est confirmée par nos résultats expérimentaux.

L'échange peut se faire entre F^- et tous les anions en solution, avec cependant une préférence pour certains (*Lindsay et coll.*, 1951).

Le couplage polymère-fluor modifie donc l'allure générale de la dissolution en un processus biphasique où les composants du couple entrent en action de façon différée, potentialisant ainsi réciproquement les effets propres de chacun d'entre eux.

V.3.E. CONCLUSION

Les résultats obtenus dans ce chapitre montrent le couplage des polymères de synthèse avec les anions F^- accentue significativement l'inhibition de la dissolution de l'hydroxyapatite et conduit à des taux de conversion bien plus faibles que ceux trouvés en présence de chacun des éléments pris séparément. Comparativement au fluorure de sodium, le couplage supprime l'accélération initiale induite par F^- seul permettant d'emblée d'obtenir une forte inhibition. Cet effet résulte d'un processus séquencé dans lequel le polymère agit majoritairement dès le début de la dissolution, alors les fluorures interviennent fortement aux temps longs. Cette action tardive des ions F^- est prouvée par l'arrêt complet des cinétiques de dissolution, montrant bien que la présence des F^- réduit la solubilité de l'apatite. Il y a donc une synergie d'action lorsque les polymères et les ions F^- sont couplés.

Nous avons systématiquement observé des rapports de congruence proches de la valeur théorique, d'autant plus proches que la concentration en fluorure augmente. Ce retour rapide à la congruence montre que les propriétés de solubilité de l'apatite changent en présence du fluorure.

L'accélération des cinétiques observées en présence de F^- seul est due à la diminution du calcium absorbé, et par conséquent la charge positive de la membrane. En

présence des polymères et en particulier ceux de structure hétérogène (PEI.CHER 2) qui sont des polycations, le calcium est maintenu à l'interface et la charge positive restaurée, ce qui diminue considérablement la perméabilité du calcium à travers la membrane interfaciale (fortes valeurs de K).

Les valeurs systématiquement proches de la congruence obtenues en présence des polymères couplés aux F⁻ montrent que, outre la diminution de la solubilité induite par les seuls F⁻, la très forte inhibition en présence de ces polymères est due à formation d'une barrière de diffusion organo-inorganique très dense à travers laquelle les produits de dégradation passent difficilement. Cette formation résulterait d'une précipitation du polymère à la surface de l'apatite, au fur et à mesure que les ions augmentent en solution.

Ces expériences montrent clairement que l'optimisation de l'effet inhibiteur des F⁻ n'est pas uniquement une question de quantité, mais aussi et surtout de qualité. La qualité se rapporte au mode de transport de ces ions grâce auquel leur adsorption pourrait s'accroître lors des changements de pH.

L'importance du mode de transport apparaît nettement quand on constate que 2,5ppm (F⁻) couplés à la PEI.CHER inhibent nettement mieux la dissolution que 22 ppm F⁻ apportés sous forme de NaF. Ce couplage est d'autant plus intéressant qu'il permet non seulement une forte inhibition, mais aussi une mise en réserve des F⁻ mobilisables.

Lors des changements de pH (passage de pH 7 à pH 5), nous avons constaté qu'en présence du polymère et plus particulièrement PEI.CHER(1 et 2), ce changement nécessitait beaucoup plus d'acide que les références, d'autant plus que la solution est concentrée.

Dans le milieu buccal, la genèse des lésions carieuses est notamment due à la chute de pH au niveau des surfaces dentaires suite au métabolisme des glucides alimentaires par les bactéries. En extrapolant l'effet de régulation de pH observé dans ces expériences en présence de la PEI.CHER (1 et 2) à ce milieu et compte tenu de leurs effets inhibiteurs très remarquables, il y a de bonnes raisons de penser que ces polymères pourront jouer un rôle de premier plan dans la prévention de la carie dentaire.

L'intérêt du couplage polymères de synthèse-ions fluorures apparaît ainsi grâce à la synergie d'action dans laquelle le polymère retarde considérablement la dissolution (effet intrinsèque) alors que les fluorures diminuent la solubilité de l'hydroxyapatite.

CHAPITRE VI
INTERACTIONS POLYMERES – BACTERIES
CARIOGENES

VI-1. POLYMERES et ADHERENCE BACTERIENNE SUR L'APATITE

VI-1.A. Matériel et méthodes

VI-1.A.1. Matériel

VI-1.A.1.a Polymères et hydroxyapatite

VI-1.A.1.b Les bactéries

VI-1.A.1.c Salive totale

VI-1.A.1.d Appareillage

VI-1.A.2. Méthodes

VI-1.B. Résultats

VI-1.B.1. Adhérence des bactéries en présence de salive

VI-1.B.2. Polymères et adhérence bactérienne

VI-1.B.3. Interprétation

VI-1.B.4. Association PEI.CHER-salive et adhérence de OMZ 175

VI-2. POLYMERES ET CROISSANCE BACTERIENNE

VI-2.A. Méthode d'étude

VI-2.A.1. Mode opératoire

VI-2.A.2 Résultats

VI-2.A.2.1. Culture témoin

VI-2.A.2.2. Effets intrinsèques des polymères sur la croissance

VI-2.A.2.3. Effets du couplage aux ions F-

VI-2.A.2.3.a. Effets de la PEI.MOR 2

VI-2.A.2.3.b. Effets de la PEI.CHER 2

VI-2.B. Interprétation

VI-3. CONCLUSION

La capacité des bactéries pathogènes à induire des infections dépend de leur aptitude à coloniser les tissus hôtes. La première étape de cette colonisation est l'adhérence aux tissus qui seront le siège de l'infection. La seconde étape qui est le développement de l'infection, est conditionnée par le cinétique de multiplication des germes au niveau du tissu cible. Les recherches dans les pathologies où les bactéries sont impliquées doivent prendre en considération ce double aspect pour essayer de mieux contrôler au moins l'un d'eux. Un tel contrôle ne pourra que permettre la mise au point des techniques ou des molécules qui limitent le plus possible ces paramètres fondamentaux des pathologies à implication bactérienne.

La carie dentaire qui est une maladie infectieuse mais liée à des interactions entre plusieurs facteurs évolue de la même façon pour ce qui est de sa composante bactérienne. Des études destinées à la compréhension du mécanisme d'adhérence des bactéries sont nombreuses; chacune développe une démarche pouvant servir de base pour des analyses à finalité prophylactique. Ainsi selon *Gibbons et coll.* (1978), les composantes cellulaires qui interagissent avec les mucines salivaires auraient un rôle dans l'adhérence. Ces composantes sont en fait des récepteurs appelés adhésines capables de réagir spécifiquement avec des éléments salivaires préalablement adsorbés sur l'émail (*Gibbons et van Houte*, 1980). Pour *Rolla et coll.* (1978), l'adhérence des bactéries sur l'hydroxyapatite est due aux interactions électrostatiques entre les groupements acides des glycoprotéines (mucines) salivaires, les ions calcium et les charges négatives de la surface bactérienne, représentées particulièrement par les groupements phosphates des acides teichoïques (TA) et carboxyliques des acides diaminopiméliques (DAPA). Quoiqu'il en soit, les bactéries adhèrent sur l'hydroxyapatite par l'un ou l'autre mécanisme et peut-être la combinaison des deux. Il est par conséquent important de tenter de perturber cette adhérence pour prévenir le développement des caries. Cette action peut être conduite soit par des réactions spécifiques mettant en jeu des récepteurs et des ligands connus, soit par des agents non spécifiques qui modifient tout simplement les interactions entre les composants externes des bactéries et la surface d'adhérence. L'agent interférant idéal serait celui qui pourrait simultanément influencer l'adhérence et la croissance des bactéries.

Les polymères de structure hétérogène sont ceux qui ont donné une plus grande efficacité dans l'inhibition de la dissolution de l'hydroxyapatite. Nous nous proposons donc de tester leur aptitude à interférer avec les processus liés à la colonisation de ce solide par les bactéries cariogènes et d'analyser les possibilités de leur utilisation étendue en prophylaxie odontologique.

VI-1. POLYMERES ET ADHERENCE BACTERIENNE SUR L'APATITE.

Une possibilité de prévention de la carie dentaire consisterait à recouvrir la surface de l'émail avec des macromolécules de synthèse susceptibles de réduire la fixation des bactéries et par conséquent le développement de la plaque. Dans cette optique, nous avons choisi de tester les capacités anti-adhésives de certains polymères dont les effets inhibiteurs sur la dissolution ont été analysés précédemment. Des études antérieures utilisant des polymères avaient déjà montré que des macromolécules peuvent compromettre la colonisation de diverses surfaces par des bactéries. *Anbar et coll.* (1974) montrent que l'adsorption de polyphosphonates sur l'hydroxyapatite réduit considérablement l'adhérence des bactéries. Selon *Humphries et coll.* (1986) les copolymères comportant des groupements latéraux éthoxy s'adsorbent sur des surfaces hydrophiles et les rendent anti-adhésives vis-à-vis des bactéries. En 1987, ces auteurs montrent que l'association de plusieurs fonctions par des greffages au sein d'un polymère accentue son caractère anti-adhésif. Le caractère anti-adhésif sera d'autant plus marqué que le polymère s'adsorbe plus fortement et résiste à l'effet de lavage. Il est difficile d'étendre spontanément ces propriétés à tous les polymères, dans la mesure où elles dépendent de la structure chimique des monomères. Cette considération structurale est d'ailleurs source de nombreuses controverses quant aux résultats expérimentaux. *Rosenberg et coll.* (1983) obtiennent une augmentation de l'adhérence des bactéries par inclusion des chaînes d'hexadécane à l'interface solide-liquide. Ils expliquent ce résultat par l'accroissement des interactions hydrophobes entre les bactéries et la surface, par l'intermédiaire de la chaîne hydrocarbonée. Cette analyse est contraire à celle de *Turesky et coll.* (1973) qui avaient montré que la présence de molécules à longues chaînes hydrocarbonées aux interfaces réduit l'adhérence bactérienne. Il est par conséquent nécessaire de faire des tests d'évaluation par lesquels chaque polymère, en fonction de sa structure, peut être classé comme fortement, moyennement ou faiblement anti-adhésif.

VI-1.A. Matériel et méthodes.

VI-1.A.1. Matériel

Le matériel utilisé pour la réalisation des expériences d'adhérence comprend principalement les polymères, l'hydroxyapatite, les bactéries, la salive totale et l'appareillage pour le comptage.

I-1.A.1.a. Polymères et hydroxyapatite

* **Les polymères** dont les propriétés anti-adhésives vont être testées sont des copolymères associant des chaînes paraffiniques et des fonctions carboxyliques ou phosphates au niveau des atomes d'azote d'une PEI préalablement méthylée. Ce sont donc des poly(ammoniums) quaternaires. Ces polymères correspondent aux dérivés PEI.MOR 1, PEI.MOR 2, PEI.CHER 1 et PEI.CHER 2. Nous limiterons notre étude à ces seuls dérivés car avec eux que les effets inhibiteurs les plus importants vis-à-vis de la dissolution avaient été obtenus. Les polymères sont préparés dans $KCl\ 5 \times 10^{-2}M$. Nous évaluerons donc l'effet du polymère seul puis celui du couplage avec les ions fluorures, en fonction des concentrations macromoléculaires.

* **L'hydroxyapatite** utilisée pour ces expériences est identique à celle qui a servi pour les expériences de dissolution.

VI-1.A.1.b. Les bactéries

Le nombre de bactéries impliquées dans la pathologie carieuse est considérable. Nous y trouvons principalement 3 genres: *Actinomyces*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*. Le genre *Streptococcus* représente environ 48% de la flore buccale et on y a identifié une espèce considérée, selon *Gibbons et van Houte* (1975) comme étant particulièrement responsable des lésions carieuses; il s'agit de l'espèce *mutans*. Nous limiterons par conséquent notre étude à cette espèce. En considérant uniquement ce cas, le nombre de germes à étudier demeure relativement grand compte tenu de l'hétérogénéité sérologique de *S. mutans*. Cette hétérogénéité est due entre autre à l'existence de 8 sérotypes conditionnés par la nature des polysaccharides de surface (*Bratthall, 1970; Perch et coll., 1974*). Nous avons en définitive choisi de réaliser notre étude avec *S. mutans* OMZ 175 (sérotipe f).

Le comptage des bactéries se fait par radioactivité, ce qui nécessite un marquage spécifique lors de la culture.

Les bactéries sont cultivées dans 5ml de milieu liquide dont la composition est la suivante:

Infusion coeur-cerveau (BHI) + 2×10^{-2} M DL thréonine
[Me- 3 H] thymidine ($0,5 \times 10^{-6}$ M; $2 \text{Ci}/10^{-3}$ M) : 100 μ l
Désoxyadénosine (dATP) (2×10^{-5} M)

L'utilisation de la thymidine, marquée au tritium sur le groupement méthyle, permet l'incorporation d'un élément radioactif dans l'ADN du *S. mutans* OMZ 175 (Schöller, 1982) de manière à faciliter sa détection par comptage scintigraphique.

L'incubation se fait pendant 18 heures à 37°C, phase à la fin de laquelle les bactéries sont centrifugées à 5000g pendant 10 minutes. Après avoir prélevé le surnageant, le culot bactérien est lavé 3 fois dans une solution de KCl 5×10^{-2} M, pH 6,8. A la suite d'une nouvelle centrifugation à 5000g et un lavage, les bactéries sont mises en suspension dans 2ml de KCl 5×10^{-2} M. La mesure de la densité optique (DO) à 540nm au spectrophotomètre donne une valeur de 1,9; ceci permet d'approximer la concentration à 1×10^9 bactéries $\times \text{ml}^{-1}$. La solution concentrée de bactéries est alors diluée dans 100ml de KCl afin d'avoir un milieu homogène à partir duquel seront réalisés des prélèvements. Les bactéries ainsi marquées à la thymidine peuvent être stockées pendant 24 heures à 4°C dans la solution de KCl.

VI-1.A.1.c. Salive totale

La salive totale est collectée dans un tube à essai refroidi sur la glace. Cette salive est chauffée à 60°C pendant 30 minutes pour inactiver les enzymes (Myerthall *et coll.* 1983). Une centrifugation à 10000g permet de se débarrasser des débris et des protéines dénaturées. Après ajustage à pH 6,8, la salive ainsi obtenue est stockée à 4°C dans un tube à essai parfaitement fermé pour éviter le dégagement de CO₂ et par conséquent les variations de pH.

La solution de bactéries marquées et la salive sont conservées dans un bac à glace pour maintenir la température à 4°C.

VI-1.A.1.d. Appareillage

Le comptage de la radioactivité qui traduit l'adhérence des bactéries sur l'hydroxyapatite se fait au moyen d'un compteur de type β (Bio-electronics SL 2000 Intertechnic). Ce comptage se fait à partir des prélèvements réalisés dans le culot précédemment dilué.

L'agitation pour homogénéiser les milieux avant les prélèvements est faite au Mixer Maxi Mix 2 Thermolyne (Bioblock Scientific Dubroque Iowa, USA).

VI-1.A.2. Méthodes

L'organisation du protocole nécessite la collection de godets de comptage que l'on regroupe en séries, en fonction du type et la concentration de la solution de polymère. Nous avons choisi pour nos expériences les concentrations suivantes: 5mg, 10mg, 20mg, 30mg, 50mg, 70mg et 100mg de polymère (PEI.CHER ou PEI.MOR) pour 100ml de solution de KCl. Dans chaque cas, le pH est ajusté à 6,8.

Dans chacun des godets préalablement tarés, on pèse 50mg d'hydroxyapatite. On y ajoute un volume (xml) de solution de polymère de manière à obtenir l'une des concentrations ci-dessus. Le polymère et l'apatite resteront en contact, sous faible agitation pendant 2 heures. Lorsque le surageant est prélevé, l'apatite recouverte de polymère est rincée 1 fois avec 5ml de la solution de KCl $5 \times 10^{-2}M$. 2ml de la solution diluée de suspension bactérienne homogénéisée sont alors ajoutés dans le godet. Cette solution restera au contact de l'hydroxyapatite pendant 1 heure, avec agitation manuelle toutes les 15 minutes. La radioactivité contenue dans 2ml de suspension bactérienne est déterminée par comptage au SL 2000.

Les surageants sont prélevés et conservés pour un éventuel contrôle. L'apatite recouverte de polymère et éventuellement de bactéries est rincée deux fois avec 2ml de KCl $5 \times 10^{-2}M$. Cette opération est destinée à éliminer les bactéries dont la fixation sur le support n'est pas irréversible (*Abbott et coll.*, 1984). Après avoir prélevé KCl, un rajout de 10ml de liquide de scintillation dans chaque godet est réalisé et la radioactivité en cpm (coups par minute) est comptée. Le nombre de cpm est proportionnel aux bactéries adsorbées sur l'apatite.

Pour avoir une base de comparaison, nous avons réalisé la même expérience en utilisant de la salive totale, afin de tester son influence sur l'adhérence des bactéries. Les volumes retenus à cet effet sont: 0,5ml, 1ml, 1,5ml et 2ml.

L'utilisation éventuelle de ces polymères en prophylaxie les mettra obligatoirement en présence de salive. Cette hypothèse nous a amené à étudier, grâce au précédent protocole, les effets de l'association polymère-salive totale sur l'adhérence de *S. mutans* sur l'hydroxyapatite. Dans ces expériences, seuls les dérivés fluorés seront testés.

Les résultats pouvant être faussés par des interactions diverses dans les godets de comptage, nous avons laissé pendant 1 heure, 2ml de suspension diluée de bactéries dans un godet qui a ensuite été rincé au KCl, afin d'estimer les possibilités éventuelles s'adsorption des bactéries sur la paroi du godet et non sur l'apatite. Les essais de comptage réalisés dans le godet vide n'ont pas permis de détecter une adsorption.

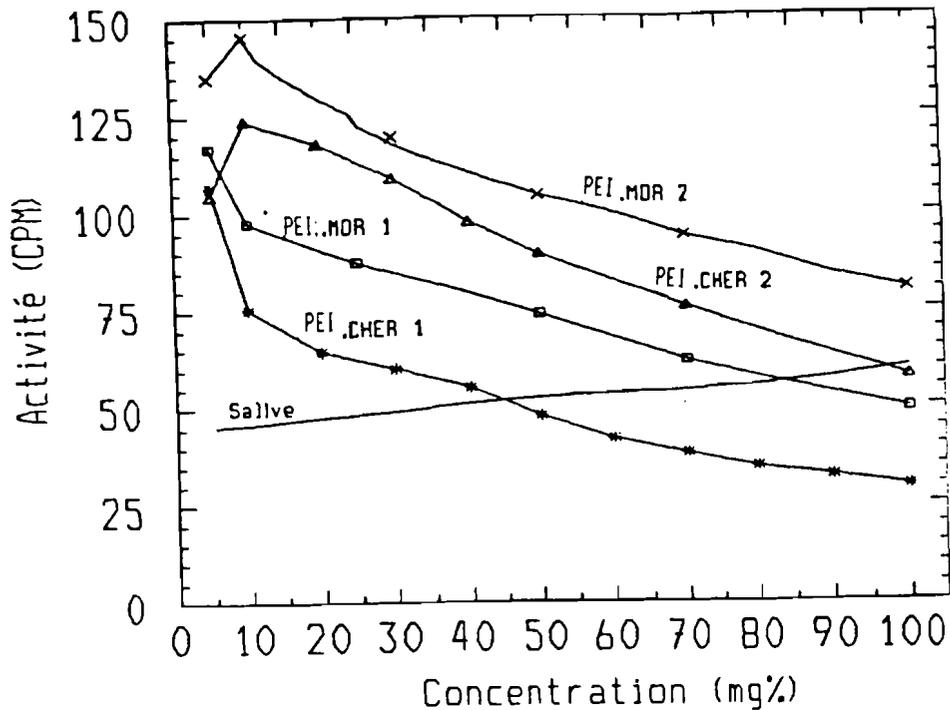


Figure VI-1: Effets des polymères PEI.MOR (1 et 2), PEI.CHER(1 et 2) sur l'adhérence de *S. mutans* OMZ 175 sur l'apatite, comparés à la salive totale.

VI-1.B.3. Interprétation

Le comportement des polymères PEI.MOR (1 et 2) et PEI.CHER (1 et 2) vis-à-vis de l'adhérence des bactéries en général et du *S. mutans* OMZ 175 en particulier peut mieux se comprendre en se rappelant deux concepts fondamentaux conditionnés par la nature des éléments en présence:

- 1- Ces polymères sont des polyélectrolytes dont la structure chimique est celle des échangeurs d'ions amphotères;
- 2- Les bactéries sont assimilables à des structures colloïdales polyanioniques (Trewick et coll. 1977) en raison de leurs charges de surface.

Il est possible d'envisager la mise en place des interactions attractives de nature électrostatique entre les sites cationiques des polymères et la surface des bactéries où les sites anioniques sont constitués par les acides teichoïques (TA) et diaminopiméliques (DAPA). Cette hypothèse est renforcée par le fait que la PEI sous la forme polycationique est fortement attirée par les colloïdes anioniques qui sont présents (DOW Chemical, 1974).

Ce genre d'interaction peut aussi s'expliquer en considérant la nature des contre-ions au niveau de l'échangeur et en solution. Le type d'échangeur représenté par ces polymères permet d'introduire une notion de sélectivité; c'est à dire que l'échangeur d'ion exerce une discrimination entre les différents contre-ions qui se trouvent dans son voisinage. Cette sélectivité explique le déplacement possible d'un contre-ion par un autre. Dans le cas des polymères testés et *S. mutans*, une telle sélectivité est envisageable compte tenu de la nature des composants anioniques de la surface bactérienne. Selon *Kressman et coll.*, (1949), l'échangeur d'anions préfère les contre-ions avec les groupes organiques qui ressemblent aux composants de l'échangeur. Nous avons des échangeurs comportant des groupements phosphoniques ou carboxyliques en présence des contre-ions organiques formés par les groupements fonctionnels des acides teichoïques et diaminopiméliques. Les contre-ions halogénures portés initialement par les échangeurs seront donc facilement déplacés en présence des bactéries. Il apparaît que PEI.MOR 1 et PEI.CHER 1 favorisent nettement moins la fixation des bactéries sur l'apatite que PEI.MOR 2 et PEI.CHER 2 (fig. VI-1). Cette différence semble lier à la nature du contre-ion.

Le résultat obtenu dans ces expériences est en accord avec l'ordre de préférentialité des échangeurs anioniques (*Lindsay et coll.*, 1951) qui ont démontré que F^- est plus facilement déplacé par les contre-ions organiques que Br^- .

Malgré cette attraction électrostatique entre polyélectrolytes cationiques et colloïdes anioniques, ces polymères présentent un effet tardif anti-adhésif vis-à-vis des bactéries, ne survenant que lorsque le maximum de sites cationiques est occupé par les premières cellules échangées. Cette saturation partielle des sites stabilise l'échangeur et lui confère des propriétés répulsives par rapport aux anions (*Treweek et coll.* 1977), effet résultant de la limitation par encombrement stérique du contre-ion initial.

La détection d'un signal radioactif plus important en présence de polymères s'explique par incorporation des bactéries marquées au sein des agrégats qu'elles forment avec ces polymères.

L'allure générale des courbes (fig. VI-1) indique un effet anti-adhésif plus important avec PEI.CHER comparé à PEI.MOR pour des couplages à des contre-ions identiques. Compte tenu de l'identité des sites cationiques entre ces polymères, la différence observée ne peut provenir que des groupements fonctionnels latéraux. Il faut à ce niveau noter que les solutions utilisées dans ces expériences d'adhérence ne renferment pas de cations divalents. Les seuls cations divalents que l'on peut trouver dans le milieu sont les ions Ca^{2+} provenant de la surface de l'apatite. Les groupements fonctionnels portés par les polymères s'ionisent en solution, présentant aussi des forces répulsives vis-à-vis des bactéries dont les charges externes sont de même signe. Une

augmentation des charges négatives sur le polymère conduira à une accentuation du caractère répulsif vis-à-vis des bactéries. La différence des effets entre PEI.MOR (carboxylés) et PEI.CHE (phosphorylés) peut ainsi s'expliquer.

VI-1.B.4. PEI.CHER-salive totale et adhérence de *S. mutans*. OMZ 175

L'effet de l'association salive-PEI.CHER (1 et 2) sur l'adhérence de *S. mutans* OMZ 175 au niveau de l'hydroxyapatite apparaît sur la figure VI-2. Les solutions de polymères sont préparés de telle sorte qu'en prélevant un volume X de la solution et qu'en le rajoutant à un volume donné de salive, les concentrations finales soient identiques à celles précédemment utilisées. Les volumes de salive restent comparables à ceux employés dans les expériences dont les résultats sont donnés ci-dessus et le protocole est identique.

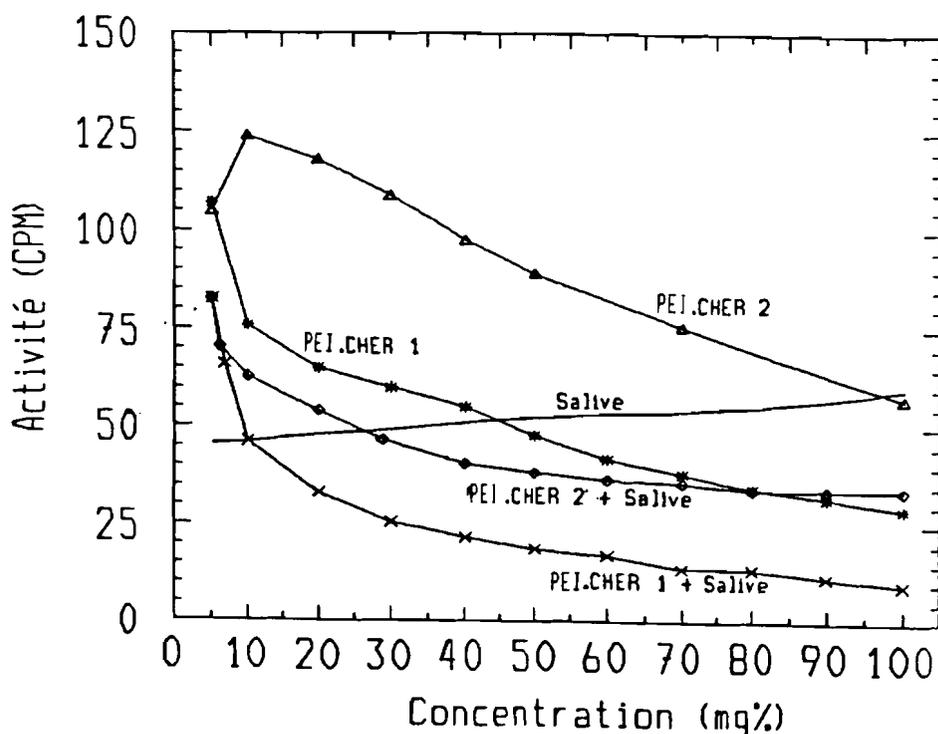


Figure VI-2: Effets l'association PEI.CHER (1 et 2)-salive totale sur l'adhérence de *S. mutans* OMZ 175 au niveau de l'apatite, comparés à la salive et au polymères seuls.

Par rapport aux polymères seuls, le nombre de bactéries fixées en présence du mélange polymère-salive est nettement plus faible. Aux concentrations faibles, les capacités anti-adhésives de PEI.CHER 1 et PEI.CHER 2 associées à des volumes salivaires identiques sont comparables; l'augmentation des concentrations accentue l'effet de PEI.CHER 1.

L'allure des courbes permet de dire que plus la concentration augmente, plus PEI.CHER 1 empêche l'adhérence de *S.mutans* OMZ 175 par rapport au mélange PEI.CHER 2-salive. L'effet de PEI.CHER 1 seule reste tout de même significativement inférieur de deux ordres de grandeur à celle de son association avec la salive totale. L'effet anti-adhésif des mélanges polymères-salive est supérieur à celui de la salive seule. Cet effet se manifeste dès les faibles concentrations.

En conclusion, nous pouvons dire que l'action des polymères synthétisés sur l'adhérence du *S. mutans* OMZ 175 au niveau de l'hydroxyapatite se déroule en deux phases. La première que nous désignons par "phase paradoxale", correspond à l'adsorption des bactéries sur les polymères. C'est une phase de potentialisation de l'adhérence, opposée à l'effet recherché. Elle s'explique par les interactions physico-chimiques entre un échangeur d'ions et les contre-ions environnants. L'échange pendant cette phase est un échange de contact si l'on considère la nature colloïdale et polyanionique de la surface bactérienne (*Helfferich*, 1962). Cette potentialisation de l'adhérence est plus marquée quand la concentration en polymère est faible.

La deuxième phase dite "phase critique" est celle pendant laquelle, par la semi saturation des sites cationiques et la limite d'échange imposée par l'encombrement stérique, les bactéries ne se fixent plus sur le polymère. La surface recouverte de polymères devient anti-adhésive. Cette propriété est celle attendue pour les macromolécules. Elle est proportionnelle au recouvrement de la surface apatitique par le polymère (effet de concentration).

L'association polymère-salive potentialise les effets anti-adhésifs de chacun deux éléments, et la "phase paradoxale"(en concentration) est brève, témoignant de la coopérativité positive entre ces entités.

PEI.MOR et PEI.CHE sont des macromolécules pouvant être utilisées pour limiter le premier stade de la colonisation des surfaces apatitiques par les bactéries, comme le montrent les expériences réalisées avec *S. mutans* OMZ 175. Le type d'interférence avec l'adhérence bactérienne peut être considéré comme non spécifique, c'est à dire que les résultats obtenus sont susceptibles d'être les mêmes avec les autres bactéries dont les constituants externes sont identiques à ceux de *S. mutans* OMZ 175.

Etant donné que les polymères potentialisent en "phase paradoxale" la fixation des bactéries sur l'hydroxyapatite au vu des résultats obtenus avec *S. mutans* OMZ 175, on peut néanmoins se poser la question de savoir l'état physiologique des bactéries agrégées par les polymères. En supposant qu'elles soient vivantes, ces bactéries sont-elles capables de se multiplier rapidement en présence de ces macromolécules?

VI-2. POLYMERES ET CROISSANCE BACTERIENNE.

La croissance bactérienne est le deuxième facteur important de la colonisation des surfaces par les germes; elle traduit la capacité d'invasion du tissu infecté. Il est par conséquent primordial de moduler ce phénomène pour limiter la prolifération bactérienne. La modulation de la croissance est préférable à la destruction systématique des bactéries pour éviter la perturbation de l'écosystème buccal qui pourrait favoriser le développement d'espèces plus pathogènes et plus résistantes.

Comme pour les études de l'adhérence, nous limiterons notre analyse à *S. mutans* OMZ 175 et les polymères précédemment testés qui sont des poly(ammoniums) quaternaires, connus pour leur action bactériostatique (*Franklin et Snow, 1971*). Jusqu'à présent, seules les molécules de faibles masses moléculaires avaient été utilisées comme inhibiteurs de la croissance bactérienne, exception faite des antibiotiques à action bactériostatique. Les dérivés cationiques généralement utilisés comme antiseptiques comprennent une partie hydrophile basique et une partie non polaire et liposoluble (généralement une chaîne hydrocarbonée relativement longue). Les plus actifs sont des sels d'ammoniums quaternaires (*Leclerc, 1981*)

Les polymères testés possèdent à l'échelle du monomère, une structure identique ces dérivés cationiques. Nous allons donc en particulier déterminer l'incidence d'une structure polymérique sur la croissance. Un autre aspect que nous analyserons concerne l'influence de F⁻ couplé au polymère sur la multiplication des bactéries.

VI-2.A. Méthode d'étude

L'action des polymères sur la croissance de *S. mutans* OMZ 175 est étudiée par spectrophotométrie. Cette technique de mesure résulte tout simplement de la photométrie des milieux absorbants.

La concentration bactérienne est évaluée par la variation de la densité optique et la quantification effectuée selon la loi de Beer-Lambert:

$$DO = \alpha l C \quad [44]$$

avec α = coefficient d'extinction molaire

l = épaisseur de la solution traversée

C = concentration de la solution

VI-2.A.1. Mode opératoire:

Après culture préalable de *S. mutans* OMZ 175 dans un milieu BHI initial contenant du glucose à 1%, 1,5ml de cette culture sont prélevés pour inoculer 15ml BHI fraîchement préparé. Un redémarrage de la croissance des bactéries grâce à l'apport de nouveaux éléments nutritifs est alors possible. On prépare autant de solutions qu'il y a de polymères à tester, plus une solution témoins. Tous les milieux contiennent donc initialement la même quantité de bactéries. Dans les nouveaux milieux, un volume d'une solution de polymère préalablement ajustée à pH 7 est ajouté de telle sorte que la concentration finale en polymère soit celle choisie pour l'expérience. On prélève alors 1ml du mélange et on lit la DO. Après chaque prélèvement, la solution est replacée dans une étuve thermostatée à 37°C, afin que les conditions de croissance des bactéries soient optimales.

Les lectures des DO sont réalisées à une longueur d'onde de 540nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman modèle 25). Les polymères sont utilisés aux concentrations de 50 et 100/100ml (m/v). Des mesures seront réalisées pour le polymère couplé à Br⁻ et à F⁻; une lecture sera faite chaque heure sur un prélèvement nouveau durant 14 heures.

Afin d'avoir une base de comparaison commune, les lectures de DO pour les solutions renfermant les polymères à différentes concentrations sont faites en même temps que les solutions de la culture témoin.

Conformément à la loi de Beer-Lambert, l'augmentation de la DO est corrélée à une augmentation du nombre (concentration) de *S. mutans* OMZ 175 dans le milieu de culture. L'évolution de ces DO avec le temps donne une description fiable de la croissance bactérienne.

VI-2.A.2. Résultats

Les effets des polymères sur la croissance de *S. mutans* OMZ 175 seront analysés par rapport à une cinétique témoin, en comparant les caractéristiques de chaque phase de la croissance cellulaire.

VI-2.A.2.1. La culture témoin

La cinétique de la croissance de *S. mutans* OMZ 175 témoin (figure VI-3) a l'allure des courbes classiques de multiplication bactérienne avec une évolution en 4 phases distinctes (Ferron, 1989).

– La phase de latence (L) d'une durée de 3 heures. Le taux de croissance y est nul.

- La phase exponentielle (E) d'environ 5 heures. C'est la phase de croissance maximale; le temps de génération est minimum.
- La phase de ralentissement (R), caractérisée par l'inflexion de la courbe de croissance. Sa durée moyenne est de 2 heures
- La phase stationnaire d'arrêt.

La comparaison entre ces différentes phases du témoin et celles obtenues en présence des polymères permet d'analyser les effets de ces molécules sur la cinétique de croissance de *S. mutans* OMZ 175.

VI-2.A.2.2. Effets intrinsèques des polymères sur la croissance

Nous considérons comme effets intrinsèques les capacités propres des polymères à interférer avec la croissance des bactéries en général, et particulièrement dans notre cas, de *S. mutans* OMZ 175. L'action des ions Br⁻ sur les bactéries n'est pas connue.

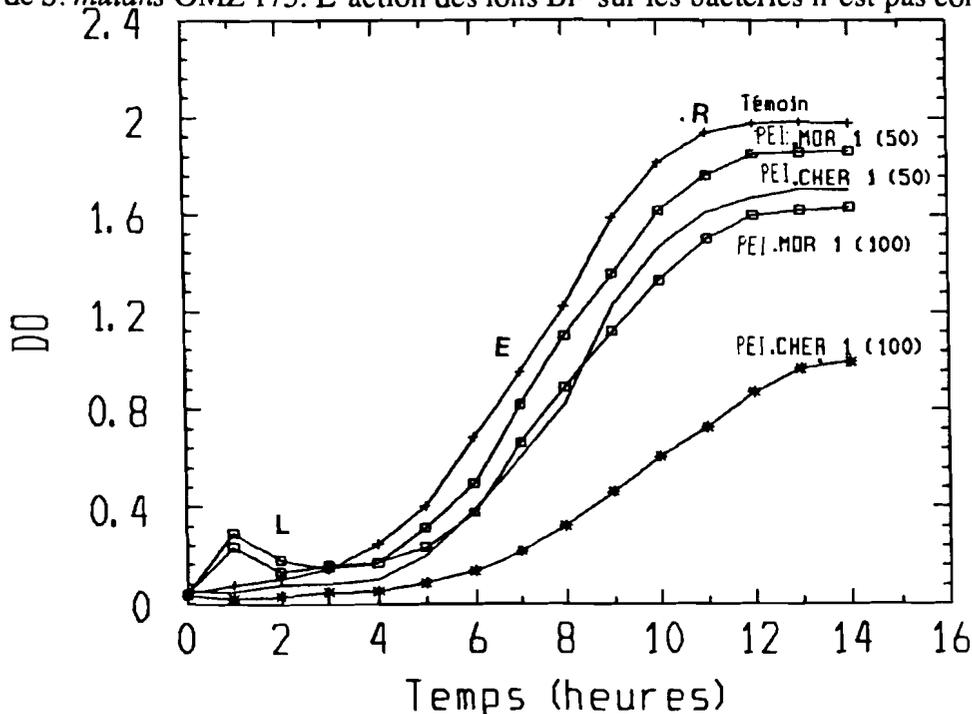


Figure VI-3: Effets intrinsèques des polymères sur la croissance de *S. mutans* OMZ 175, comparés à un témoin.

PEI.MOR 1 prolonge de 1 à 2 heures la phase de latence. Cette phase est d'autant plus longue que la concentration du polymère dans le milieu de culture est élevée. La différence des pentes de croissance en phase exponentielle montre bien un décalage par rapport au témoin. La concentration la plus importante conduit à un arrêt plus rapide de la croissance des bactéries.

Pour la suspension bactérienne de départ, la radioactivité est de 3800 cpm/ml. Il est cependant difficile de faire un rapport direct entre le nombre de bactéries adsorbées et le nombre de cpm car le marquage peut se faire en plusieurs endroits de l'ADN bactérien et l'activité dans ce cas sera considérable. Nous ne tiendrons donc que du nombre de cpm comptés sans le convertir en nombre de bactéries.

VI-1.B. Résultats

Ces résultats sont présentés (figure VI-1).

VI-1.B.1. Adhérence des bactéries en présence de salive

Les variations du volume ne semblent pas affecter particulièrement le nombre de bactéries adsorbées car sur l'apatite traitée avec 0,5ml de salive, on détecte 45 cpm alors que sur celle traitée avec 2ml de la même salive, il n'y a que 60 cpm, comme cela apparaît sur la figure VI-1. (Pour les unités du graphe dans ce cas, seuls comptent les cpm et pas les concentrations).

VI-1.B.2. Polymères et adhérence bactérienne

Comparativement à la salive totale, les polymères aux faibles concentrations semblent potentialiser l'adhérence des bactéries sur l'apatite, indépendamment de la structure. Cette potentialisation diminue avec l'augmentation de la concentration, montrant ainsi que les polymères favorisent moins d'adhérence que la salive.

Si dans l'ensemble les PEI.CHER donnent un meilleur effet anti-adhésif que les PEI.MOR, il convient de constater que dans tous les cas, PEI.CHER 1 et PEI.MOR 1 ont plus d'effet que leur version PEI.CHER 2 et PEI.MOR 2. La seule différence entre les dérivés de la même classe, signalons le une fois de plus est uniquement le contre-ion.

En présence de PEI.CHER 1, les phases de latence sont plus longues de 1 à 2 par rapport au témoin. Les cinétiques en phase exponentielle sont d'autant plus lentes que la concentration du polymère est forte. Comme avec PEI.MOR 1, la croissance de *S. mutans* est stoppée bien avant que la cinétique de croissance du témoin n'entre en phase de ralentissement. En présence de PEI.CHER 1, il y a donc décalage des phases de croissance de *S. mutans* OMZ 175 par comparaison au témoin.

Bien que les deux types de polymères testés montrent des effets importants sur la croissance des bactéries, il apparaît que PEI.CHER 1 retarde plus cette croissance que PEI.MOR 1. La phase de latence est plus longue en présence de la PEI.CHER 1. à 100mg%(m/v) et les phases de croissance exponentielle sont plus lentes et brèves en présence de la PEI.CHER 1.

VI-2.A.2.3. Effets du couplage aux ions F⁻

Le changement du contre-ion au niveau des sites de quaternisation est susceptible de modifier significativement les propriétés chimiques et physiques d'un ammonium quaternaire. Cette modification peut accentuer les interactions de la molécule avec son environnement en facilitant le contact comme nous venons de le démontrer.

VI-2.A.2.3.a. Effet de la PEI.MOR 2 (figure VI-4)

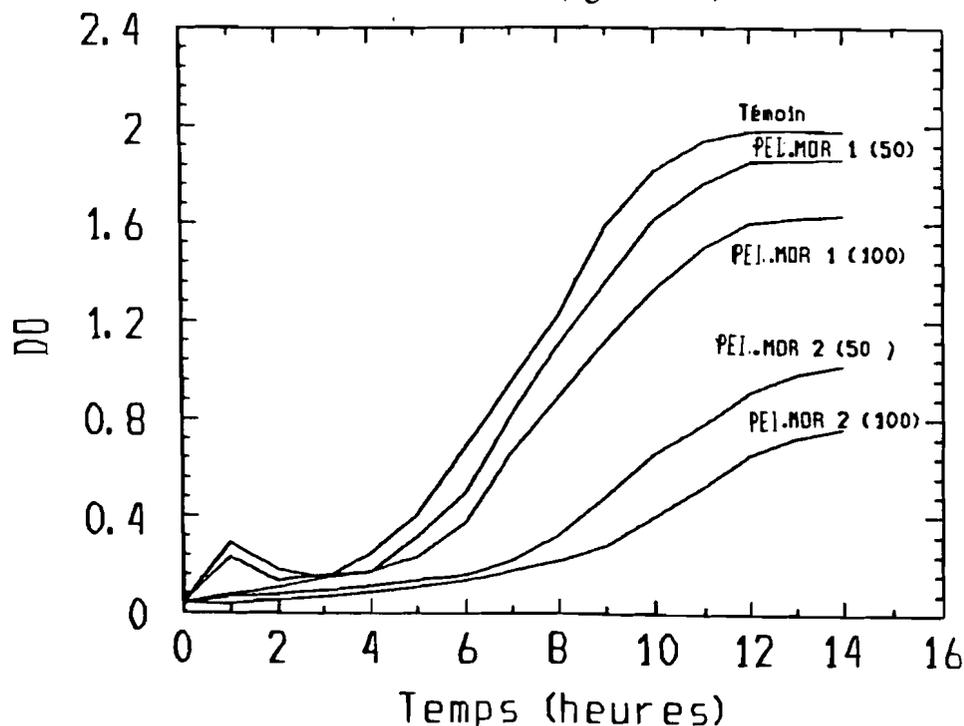


Figure VI-4: Effets de PEI.MOR 2 sur la croissance de *S. mutans* OMZ 175, comparés à PEI.MOR 1 et le témoin.

L'action de ce polymère sur la croissance bactérienne est très importante par comparaison au témoin et PEI.MOR 1. La phase de latence est deux fois plus longue et peut atteindre 7 à 8 heures avec la concentration. La phase exponentielle est plus lente et s'achève prématurément. Comme dans les cas précédents, la concentration du polymère dans le milieu joue un rôle important dans l'accentuation des interactions du polymère et la croissance bactérienne.

La structure de base de PEI.MOR 2 et PEI.MOR 1. est la même. La seule différence est le contre-ion qui, dans le premier est F⁻ alors qu'il s'agit du Br⁻ dans le deuxième. La différence des effets sur la croissance de *S. mutans* en présence de l'un et de l'autre permet de conclure que la nature du contre-ion intervient dans l'action qu'un polyélectrolyte cationique peut avoir sur la croissance bactérienne.

VI-2.A.2.3.b. Effet de PEI.CHER 2

Il apparaît clairement que *S. mutans* OMZ 175 ne se multiplie que faiblement en présence de ce polymère (figure VI-5). Le début de croissance apparaît après environ 10 heures et l'incidence de la concentration sur le processus est faible.

L'effet de PEI.CHER 2 sur la croissance est plus important que celui de PEI.CHER 1, à toutes les concentrations.

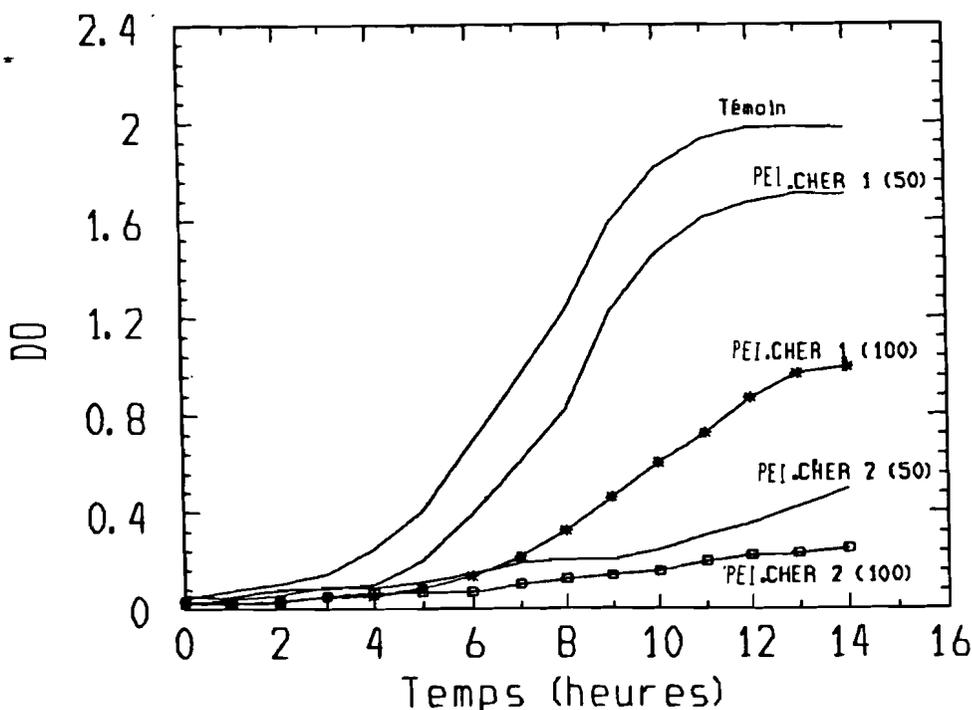


Figure IV-5: Effets de PEI.CHER 2 sur la croissance de *S. mutans* OMZ 175 comparés à PEI.CHER 1 et le témoin.

VI-2.A.2.3.c. Comparaison des effets de couplage au F⁻

PEI.CHER 2 a une action plus restrictive sur la croissance cellulaire que PEI.MOR 2 (figure VI-6). Cette différence d'action confirme celle résultant de l'effet intrinsèque des polymères dans la mesure où, aux concentrations utilisées dans ces expériences, les solutions de la PEI.MOR 2 contiennent 33 ou 66 ppm de F⁻, alors que celles du PEI.CHER 2 n'en contiennent que 25 ou 50. Si dans l'ensemble il est indiscutable que la qualité du contre-ion renforce les propriétés antibactériennes des polymères, celui-ci ne peut cependant pas être considéré comme l'élément principal dans cette action. *Hermann et coll.*, (1958) avaient déjà aussi montré que des perturbations respiratoires chez les bactéries en présence de NaF ne surviennent que lorsque la teneur en F⁻ est de l'ordre de 100 ppm, teneur bien supérieure à celles utilisées dans nos expériences.

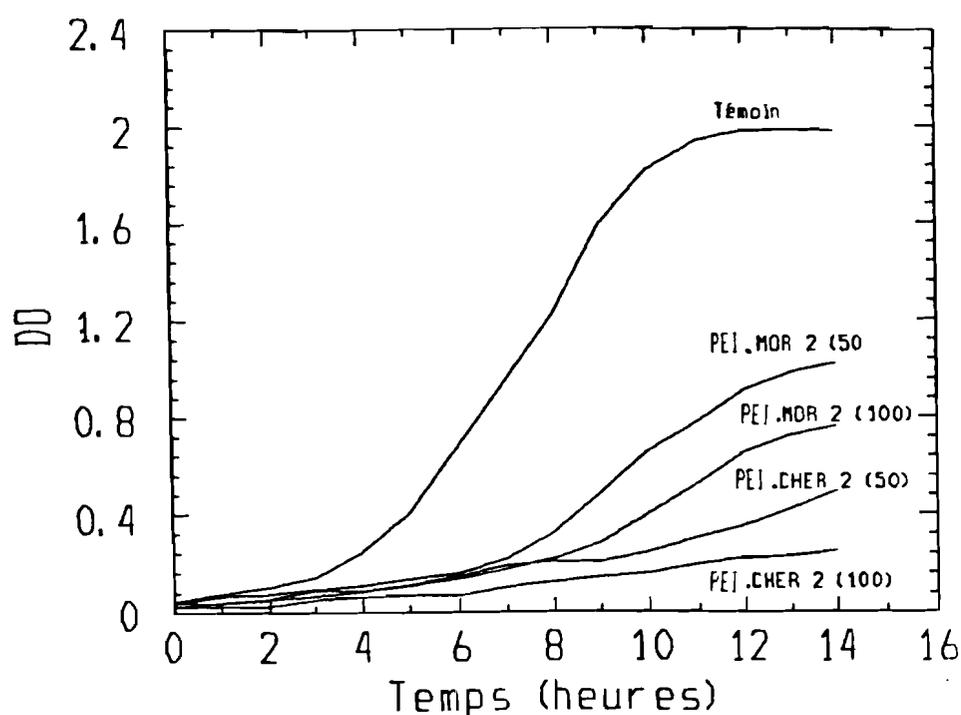


Figure VI-6: Comparaison des effets de PEI.CHER 2 et PEI.MOR 2 sur la croissance de *S. mutans* OMZ 175.

VI-2.B. Interprétation

Au vu des résultats obtenus avec les polymères, nous pouvons confirmer que ces macromolécules amphotères ont également des propriétés de bactériostase que *Ferron* (1989 définit comme une atteinte de la croissance bactérienne telle que le nombre de bactéries formées soit inférieur à celui de la croissance du témoin, mais supérieur ou à la limite égal au nombre de bactériesensemencées; il n'y a pas destruction globale des bactéries.

Cette propriété est concentration-dépendante et variable avec la nature du polymère. L'influence de la nature moléculaire est illustrée par la différence nette entre l'effet de PEI.MOR et de PEI.CHER. L'association de groupements fonctionnels semblent jouer un rôle important dans la potentialisation de cette bactériostase, si on se rapporte aux effets observés pour PEI.MOR et PEI. CHER.

La nature du contre-ion dans cette action a son importance comme lors de l'adhérence. Les écarts d'action par couplage à F^- et Br^- en témoignent. Si le contre-ion en lui-même peut avoir un effet propre, il nous semble que la facilité avec laquelle il est déplacé du site cationique par la bactérie est un facteur important pour l'intensification des contacts entre le site en question et les constituants bactériens. Plus le contre-ion sera déplacé rapidement, plus le polycation auquel il est couplé sera bactériostatique. Les expériences précédentes montrent que Br^- quitte plus difficilement le site cationique que F^- ; expliquant probablement ainsi les raisons de la faible bactériostase de PEI.MOR 1 et PEI.CHER 1 comparativement aux dérivés PEI.MOR 2 et PEI.CHER 2.

Il ressort de cette analyse que la bactériostase pour un polymère cationique varie selon la nature du contre-ion et les groupements fonctionnels latéraux associés.

L'action des ammoniums quaternaires au niveau des structures biologiques bactériennes est assez mal connue. L'effet général semble tenir de la dénaturation de la membrane cytoplasmique. *Hermann et coll.* (1958) proposent une action basée sur le changement de perméabilité membranaire qui perturberait secondairement le métabolisme. Une telle dénaturation proviendrait des interactions entre l'ammonium qui soit s'additionne, soit se substitue à certains lipides ou stérides membranaires qui se trouvent par conséquent dissociés (*Dervichian*, 1963). L'une des structures membranaires cible de l'action de ces ammoniums est, selon *Tsuchida* (1979) le dipalmitoyllecithine qui est un phospholipide. Pour *Treweek et coll.* (1977), après fixation des bactéries sur le polycation, un processus de coagulation s'enclencherait, aboutissant à la modification de la perméabilité de la membrane bactérienne.

Il semblerait donc que l'action bactériostatique des polymères soit liée à l'un ou l'autre mécanisme, mais que l'effet déterminant soit la perturbation de l'équilibre hydrodynamique dans l'environnement bactérien. Le rôle propre du contre-ion au niveau bactérien est difficile à apprécier à partir de ces expériences; il est néanmoins connu que les ions fluorures perturbent le métabolisme bactérien. Dès 1934 *Lohmann et Meyerhoff* (cités par *Hamilton*, 1990) montrent que les ions fluorures inhibent l'énolase, enzyme de la glycolyse qui transforme le 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate. En 1981, *Edgar et coll.* ont également montré que la pénétration des ions fluorures dans la bactérie perturbait son métabolisme. Cette perturbation métabolique peut constituer un

élément non négligeable pour les propriétés bactériostatiques des polycations avec F⁻ comme contre-ion.

VI-3. CONCLUSION

Les polymères synthétisés perturbent considérablement les deux phases de la colonisation des surfaces par les bactéries cariogènes dont *S. mutans* OMZ 175. Si aux faibles concentrations ils semblent potentialiser la fixation des bactéries sur l'apatite, ce résultat paradoxal s'estompe, au fur à mesure que la concentration en polymère augmente.

La croissance bactérienne est remarquablement retardée en présence de ces polymères, l'effet étant néanmoins plus marqué avec les dérivés fluorés. Ceci témoigne de la potentialisation des actions propres aux polymères et aux fluorures comme cela a déjà été montré pour la dissolution de l'hydroxyapatite.

Le paradoxe de l'attraction des bactéries l'est uniquement par rapport au résultat escompté, mais n'en est pas un si l'on considère les structures polycationique et polyanionique des polymères et des bactéries. Par le phénomène de pontage intermoléculaire, les polymères favorisent dans un premier temps l'agrégation des bactéries. Cette phase d'attraction terminée, l'action cationique s'enclenche, avec altération structurale de la bactérie. Le mécanisme fondamental de cette action reste à déterminer car, compte tenu de la structure macromoléculaire et spatiale des polymères, nous ne savons pas s'ils sont en mesure de diffuser à travers la paroi pour atteindre la membrane et y agir. Malgré la complexité éventuelle du mécanisme de cette action, nous retiendrons pour ces polymères une action en double phase: attraction et répulsion suivies de la bactériostase.

Ces interactions polymères-bactéries peuvent se résumer de façon anecdotique par cette phrase de Corneille dans BRITANNICUS qui dit:

“J’embrasse mon rival, mais c’est pour mieux l’étouffer”.

CHAPITRE VII.

TOXICOLOGIE DES PEI

VII-1. Applications industrielles des PEI

- * Industrie du papier
- * Traitement des eaux
- * Industrie minière
- * Industrie textile
- * Photographie
- * Industrie du triage
- * Tensio-actifs

VII-2. Applications Biomédicales des PEI

- * Onco-Hématologie
- * Hépatologie
- * Enzymologie
- * Dermatologie
- * Cytologie
- * Toxicité aigüe

VII-3. Conclusion

Les transformations réalisées sur les molécules utilisées dans l'étude de l'inhibition du processus de dissolution des hydroxyapatites nous ont permis de montrer que l'on peut orienter les synthèses de polymères de manière à obtenir des structures macromoléculaires appelées à jouer un rôle prédéterminé. Nous avons dans cette étude montré que des copolymères associant des chaînes hydrocarbonées relativement longues et des fonctions chimiques bien choisies peuvent être de parfaits agents inhibiteurs de la dissolution. Une utilisation en clinique de ces molécules dans le cadre de la prophylaxie de la carie dentaire et éventuellement d'autres maladies liées au développement de la plaque bactérienne nécessite une certaine connaissance de la toxicité liée aux poly(éthylèneimines) (PEI) et de la polyéthylloxazoline (PEOX).

VII.1. APPLICATIONS INDUSTRIELLES des PEI

Les PEI sont des macromolécules utilisées dans divers secteurs de l'industrie. Elles sont employées tant sous la forme linéaire que sous forme quaternaire avec des chaînes alkyles et des fonctions de natures variées selon les besoins. Compte tenu de l'abondance des travaux décrivant les usages industriels des PEI, il est difficile d'en dresser une liste exhaustive. *Hoover* (1970) était un des premiers à résumer de telles applications.

* **Industrie du papier**: Les PEI sont utilisées pour accélérer le séchage de la pâte à papier et retenir les fines particules, les pigments et les teintes diverses. Ces applications font appel aux interactions électrostatiques entre le polymère et les particules, ainsi qu'à la densité de charge linéaire de laquelle dépendent les propriétés du polymère. Malgré l'utilisation des quantités très importantes de PEI dans ces industries, des cas d'intoxication chronique ou aigue n'ont jamais été signalés.

* **Traitement des eaux**: Les propriétés complexantes des PEI permettent leur utilisation dans le traitement des eaux. Cette application a été initiée par *Flock et coll.* (1973). Ces polymères sont actuellement utilisés aux Etats Unis comme agents de clarification des eaux potables (*Bikales et coll.*, 1985).

* **Industrie minière**: L'extraction des minerais nécessite la séparation de divers métaux entre eux. Les propriétés complexantes des PEI sont mises à profit dans de telles opérations. La formation des complexes par les PEI linéaires est liée à la présence sur l'azote d'un doublet libre qui réagit avec un atome possédant une orbitale vacante; c'est le cas du zinc, du nickel, du cuivre, etc.... Les opérations de mise en oeuvre de ces séparations sont réalisées par l'homme et aucun cas d'intoxication n'a jusqu'à présent pas enregistré.

* **Industrie textile:** Grâce à leurs propriétés complexantes, les PEI sont utilisées dans le textile pour augmenter la résistance des fibres et éviter le rétrécissement au lavage. Ces polymères sont utilisés lors de la teinture et l'impression des fibres textiles. Lorsque le tissu est tissé, la PEI est utilisée comme agent assouplissant.

Les PEI sont des macromolécules thermiquement résistantes. Dans l'air elles résistent à des températures de plus de 380°C; elles entrent pour cette raison dans la confection des équipements anti-flammes (*Smith, 1979*).

* **Photographie:** Les sels de poly(ammonium) quaternaires des PEI sont utilisés en photographie comme agents antistatiques (*Evva et coll., 1958*). Ils sont aussi utilisés pour la liaison des écran-filtres colorés. Les PEI entrent également dans la composition des bains de coloration (*Campbell, 1979*) où elles servent comme sensibilisateurs des halogénures d'argent.

* **Industrie du triage:** Les PEI et leurs dérivés quaternaires sont largement utilisés pour séparer des particules dans des solutions. Ces polymères sont utilisés comme échangeurs d'ions (*Saegusa et coll., 1978*) résines chélatantes (*Evani et coll., 1979*). Les modifications structurales permettent de constituer avec ces polymères des membranes à perméabilité sélective pouvant jouer le rôle de filtre dans divers domaines. Ces polymères peuvent également trouver des applications en chromatographie (*Christianson et coll., 1968*).

* **Les tensioactifs:** Les PEI comme leurs dérivés sont très utilisés dans la préparation des tensioactifs. Ces sels d'ammonium quaternaires sont utilisés comme agents de séquestration et additifs de détergents, comme additifs de champings, de savons et des spray pour cheveux. Ils interviennent dans la stabilisation des émulsions et sont eux-mêmes de bons émulsifiants. On les retrouve dans la composition des lubrifiants et additifs des huiles. Les PEI sont utilisés pour combattre la corrosion.

Cette utilisation variée des PEI dans des secteurs industriels aussi distincts permet de penser que la toxicité de ces polymères est extrêmement faible. Cette faible toxicité a récemment permis à la firme *Dow Chemical* (1985) d'introduire auprès de la Food and Drug Administration des demandes autorisant l'incorporation des PEI dans la composition des produits d'emballage alimentaire.

VII.2. APPLICATIONS BIOMEDICALES des PEI.

De nombreux essais d'utilisation biomédicale des PEI ont été réalisés et ont montré des actions potentiellement bénéfiques pour certains dérivés. Des tests de toxicité aigue ont été récemment menés sur les animaux de laboratoire.

* **Onco-Hématologie:** Les dérivés tertiaires des polymères aminés ont été testés pour leurs applications en hématologie. Sans entrer dans les détails pharmacologiques, il a été montré par *Marchisio et coll.*, (1970) que certains polymères aminés, grâce à leurs propriétés complexantes, peuvent neutraliser l'héparine et retarder son action anticoagulante. Cette interaction tient à la structure même de l'héparine qui est un mucopolysaccharide contenant entre autre des groupements carboxyliques et sulfamiques; en solution aqueuse, elle se comporte comme un polyanion à forte densité de charges. Une des molécules testées dans cette étude est la poly(N,N-diethylallylamine) partiellement N-oxydée. Ce polymère, totalement N-oxydé, présente, d'après ces auteurs, des propriétés antisilicogènes.

Ferruti et coll., (1979) montrent que les polyimines réduisent considérablement la taille et le nombre de métastases chez les rats auxquels une insémination avec des cellules cancéreuses est réalisée. Dans la même application, *Moroson et coll.*, (1975) montrent que, par les mécanismes d'adsorption spécifique faisant intervenir les charges de l'adsorbant, les polycations de type PEI quaternaires inhibent la croissance des tumeurs allogéniques et syngéniques chez le rats. Le polymère se fixe uniquement sur les cellules tumorales sans affecter les cellules saines. Cette spécificité de liaison peut résulter de la présence sur les cellules tumorales de récepteurs qui reconnaîtraient une partie (probablement les sites quaternaires) du polymère. La lipophilie de ces sites favoriseraient secondairement leur pénétration dans la cellule où peuvent avoir lieu des interactions antiprolifératives.

* **Hépatologie:** *Frank et coll.*, (1967) mettent au point un produit destiné à lier "in vivo" des acides biliaires. Ce produit est obtenu par estérification de l'acide poly(acrylique) avec la PEI quaternisée dont une des chaînes latérales porte un groupement hydroxyle. Les essais chez les chiens ont montré un taux de rétention de l'acide glycolique de 91%.

* **Enzymologie:** Les modifications structurales des PEI sont relativement faciles à développer. *Overberger et coll.*(1980) ainsi que *Ludwig et coll.*, (1982) greffent sur la PEI des dérivés de la thymine, des fractions d'imidazoles et des groupes uraciles. Le polymère ainsi transformé possède une activité proche de celle de l'estérase. De plus ce type de transformation permet de synthétiser assez facilement des analogues d'acides nucléiques.

* **Dermatologie:** *Tomalia et coll.*, (1978) montrent que les polyamines peuvent être utilisées dans le traitement curatif et préventif des dermatites causées par des plantes dont le contact favorise le développement des sumacs vénéneux. Une application topique est suffisante dans ce cas.

* **Cytologie:** Dans une étude des interactions entre polycations et membrane d'érythrocytes humains, *Tsuchida* (1979) montra que l'interaction d'un polyammonium avec la bicouche lipidique des biomembranes augmente leur fluidité. Cette augmentation de la fluidité membranaire favorise soit l'agrégation et la fusion cellulaire, soit alors une cytolysse. La modification de la fluidité membranaire résulte de la formation d'un complexe macromoléculaire entre le polycation et l'un des phospholipides de la membrane, en particulier le dipalmitoyllecithine. Dans cette étude, l'auteur montre que l'activité cytolytique du polycation est d'autant plus grande qu'il comporte de longues chaînes alkyles latérales. Lorsque plusieurs cellules sont en présence d'un polycation, il se produit d'abord une agrégation puis la cytolysse. Cette capacité cytolytique des polycations avait déjà été présentée par *Klotz et coll.*(1969) qui avaient montré que les PEI se lient fortement aux lipides et accélèrent l'hydrolyse des esters d'acides gras à longues chaînes, au pH physiologiques.

* **Toxicité aiguë:** La toxicité des PEI est extrêmement faible, (*Bikales et coll.* 1985). Les essais d'intoxication par voie orale chez le rat et par absorption percutanée chez le lapin ont donné dans les deux cas des DL_{50} supérieures à 4g/Kg. Le contact avec les yeux et avec la peau chez le lapin et le cobaye ne provoque ni irritation, ni sensibilisation. Les tests en milieu aquatique montrent également la faible toxicité de la PEOX et ses dérivés (*Dow Chemical*, 1985).

Du point de vue des applications, nous pouvons noter que toutes les utilisations des PEI sont en rapport avec leurs propriétés complexantes, les possibilités de transformations chimiques et la présence d'une forte densité de charges linéaire sur le polymère.

VII-3. CONCLUSION

Après cette brève revue des applications industrielles, biomédicales et quelques essais toxicologiques des poly(éthylène imines), il apparaît clairement que ces macromolécules sont très utilisées. Cette utilisation serait certainement beaucoup plus limitée si le polymère et ses dérivés étaient hautement toxiques. Nous pouvons dès à présent estimer que les polymères synthétisés pourront être utilisés en clinique humaine sans risque majeur. Cela ne signifie pour autant pas que des tests plus appropriés ne devront plus être réalisés avant leur utilisation éventuelle en clinique dentaire.

CONCLUSION

•

L'approche de la pathologie carieuse sous l'angle déminéralisation nécessite au préalable une bonne compréhension des mécanismes de dissolution de l'hydroxyapatite, afin de dégager les principaux paramètres qui la gouvernent. Les nombreux modèles proposés dans la littérature attestent de la difficulté à déterminer de manière simple de tels paramètres. Le modèle développé dans notre laboratoire tient compte des charges interfaciales en montrant que l'adsorption du calcium sur la surface de l'apatite inhibe fortement la dissolution grâce à la formation d'une membrane interfaciale chargée, semi-perméable. La charge, en raison de la présence des ions calcium, est positive. Par cette semi-perméabilité et ses charges, la membrane ralentit la diffusion du calcium tout en facilitant celle des anions. La membrane est d'autant plus inhibitrice qu'elle est chargée, épaisse, dense et fortement adsorbée.

Les paramètres de ce modèle permettent de déterminer les caractéristiques que doivent posséder des molécules destinées à l'inhibition de la dissolution: adsorption irréversible sur l'apatite, favorisant ainsi la mise en place d'une couche interfaciale plus épaisse; couplage facile avec les autres inhibiteurs connus de la dissolution; interactions avec les autres facteurs initiateurs de la carie comme l'adhérence et la croissance bactériennes.

La prise en compte de ces paramètres nous a orienté vers la synthèse de polymères susceptibles de satisfaire aux caractéristiques d'un inhibiteur "idéal" de la dissolution acide des apatites. Ces polymères sont des dérivés de la poly(éthylène imine) (PEI), obtenue par hydrolyse de la polyéthylloxazoline (PEOX). Nous avons ainsi synthétisé des PEI à azotes secondaires, tertiaires et quaternaires qui ont été couplés à des anions Cl^- , Br^- et F^- . Ce couplage ionique permet aux polymères synthétisés de se comporter comme des échangeurs d'ions amphotères. Ces synthèses ont conduit à des dérivés dont la pureté est de l'ordre de 97%.

Par leurs caractéristiques individuelles, les polymères retardent considérablement la dissolution de l'hydroxyapatite en milieu acide en potentialisant l'accumulation du calcium à l'interface et en renforçant les propriétés de la membrane adhérente inhibitrice dont la perméabilité diminue fortement. Cette potentialisation dépend de la masse moléculaire, la complexité structurale du polymère ainsi que de la présence de sites cationiques permanents, indépendamment des variations de pH. L'inhibition obtenue en présence de ces polymères chargés montre bien que l'adsorption des charges positives à l'interface est un facteur important dans le contrôle du processus de dissolution acide de l'hydroxyapatite.

Si dans leur ensemble tous les polymères synthétisés induisent, grâce à leurs spécificités, une forte inhibition du processus de dissolution de l'hydroxyapatite, les

effets les plus importants sont cependant atteints avec les poly(éthylèneimines) de structure hétérogène et plus particulièrement le dérivé comportant des groupements phosphonates (PEI.CHER 1.). Ses effets augmentent avec la concentration du polymère en solution. Ce polymère satisfait donc aux caractéristiques définies pour une inhibition forte. Les effets induits par ce polymère s'expliquent par l'importance des interactions hydrophobes, des charges positives permanentes dues à la quaternisation, ainsi que les propriétés de chélation. La diminution des activités ioniques du calcium en solution avec la complexité du polymère indique que la membrane interfaciale limite considérablement la diffusion et que son efficacité est d'autant plus grande que le polymère possède une structure complexe. Ce ralentissement de la diffusion serait non seulement lié à une augmentation de l'épaisseur de cette membrane, mais également à sa densification qui résulterait d'une précipitation du polymère à la surface de l'apatite. Par leurs effets intrinsèques, les polymères synthétisés peuvent être considérés comme d'excellents inhibiteurs de la dissolution des apatites.

Le couplage des polymères aux ions F^- induit une inhibition plus importante que celle obtenue avec le polymère ou le fluorure de sodium seul. Des concentrations de F^- 4 à 5 fois plus importantes sous forme de NaF donnent une inhibition nettement moindre que des faibles quantités de cet anion couplées aux polymères. Cette action résultant du couplage permet de dire qu'il y a synergie d'effet entre le polymère et les fluorures. Par diminution du calcium adsorbé en présence de F^- seul (diminution de la charge positive interfaciale), la réaction de dissolution s'accélère aux instants initiaux et s'arrête complètement peu après. Cet arrêt résulte de la modification des propriétés de solubilité de l'apatite en présence de F^- , avec une atteinte plus rapide de l'équilibre. Le couplage polymère- F^- présente l'avantage d'éliminer complètement la phase d'accélération initiale induite par les ions F^- seuls pour conduire d'emblée à une inhibition forte. Couplé aux ions F^- le dérivé comportant des groupements phosphates est encore le plus efficace dans l'inhibition du processus de dissolution.

Le couplage des polymères avec les ions F^- permet une double action sur le processus de dissolution de l'apatite. Le polymère retarde la dissolution aux instants initiaux, alors que les ions F^- diminuent la solubilité de l'apatite. La combinaison de ces propriétés permet d'expliquer la forte inhibition induite par le couplage, comparativement à NaF ou le polymère seul.

La libération de F^- par les polymères et notamment PEI.CHER 2 est un processus lent, mais pouvant s'accélérer suite à une modification de pH. De plus lors de la mise en solution du polymère couplé aux fluorures, tous les F^- ne sont pas spontanément libérés, une partie restant associée au polymère. Ces polymères peuvent donc être utilisés comme

des réservoirs de F^- dont la libération est espacée dans le temps, assurant de la sorte une protection prolongée contre la dissolution.

Les mesures réalisées en présence des bactéries montrent que les polymères de structure hétérogène ne sont pas uniquement de très bons inhibiteurs de la dissolution, mais interfèrent aussi avec la croissance et l'adhérence du *streptocoque mutans*, principale bactérie impliquée dans la genèse des lésions carieuses. Les dérivés couplés aux ions F^- perturbent moins bien l'adhérence que ceux couplés aux ions Br^- , cas dans lequel l'effet intrinsèque est plus important que l'effet du couplage aux F^- . Néanmoins ces polymères présentent un effet général intéressant vis à vis du contrôle de la croissance et de l'adhérence des bactéries cariogènes.

Les nombreuses applications industrielles et biomédicales des PEI et les autres molécules de la même famille permettent de considérer que les polymères synthétisés ne sont pas toxiques et leur utilisation clinique éventuelle ne posera en principe pas de problèmes majeurs.

Les résultats obtenus dans cette étude des effets de polymères de synthèse sur le processus de dissolution de l'hydroxyapatite montrent parfaitement l'intérêt de la modélisation dans la conception des molécules ayant une fonction prédéterminée. De tels résultats sont d'autant plus encourageants qu'ils ne sont pas uniquement reproductibles, mais prévisibles grâce à notre modèle.

Au terme de ce travail, nous pouvons dire qu'avec les polymères de synthèse, de réels espoirs sont permis pour le développement de nouvelles méthodes de prévention de la carie dentaire et d'autres pathologies bucco-dentaires où l'adhérence des bactéries joue un rôle prépondérant. Une étude plus approfondie devrait cependant préciser les conditions d'une adsorption importante avant d'envisager les essais sur animaux, et définir dans quelles conditions l'utilisation de ces inhibiteurs de la dissolution de l'hydroxyapatite pourrait être appliquée en clinique humaine, pour une prophylaxie à court et à long terme. En considérant les interactions entre le ions calcium (et phosphate) et ces polymères, une étude de leur implication dans le contrôle de la formation du tartre serait un apport supplémentaire important dans la prévention des pathologies bucco-dentaires. Les possibilités relativement étendues de transformation des polymères testés dans cette thèse permettent le développement de nouvelles molécules dont les effets seront bénéfiques pour la prophylaxie des pathologies de l'odonte et du parodonte.

BIBLIOGRAPHIE

..

ABBOT A. and HAYES M.L.: The conditioning role of saliva in Streptococcal attachment to hydroxyapatite surfaces.

J. General Microbiology **130**: 809-816, (1984).

AKHMEDOV U.K., MIRZAEV A.T. and AKHMEDOV K.S.: The synthesis and the investigation on colloid and chemical properties of biquaternary ammonium salts of poly(3-3-diamino-N-N,N'N'-tetraethyl) propylene. in: *Polymeric amines and ammonium salts*. Goethals. Ed. Pergamon, IUPAC, (1979).

AMES B.N.: Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.***8**: 115-121, (1966).

AMJAD Z., KOUTSOUKOS P.G. and NANCOLLAS G.H.: The crystallization of fluoroapatite. A constant composition study.

J. Colloid Interface Sci. **82**: 394-400, (1981).

ANBAR M., JOHN St G.A. and SCOTT A.C.: Organic polymeric polyphosphonates as potential preventive agent of dental caries: *in vitro* experiment. *J. Dent. Res.* **53**: 867-878, (1974a).

ANBAR M., FARLEY E.P., DENSON D.D., and MALONEY K.R. Localized fluoride release from fluorine carrying polyphosphonates.

J. Dent. Res. **58** (3): 1134-1145, (1979).

ARENDS J. and DAVIDSON C.L.: HPO_4^{2-} content in enamel and artificial carious lesions. *Calcif. Tissue Res.* **18**: 65-79, (1975).

ARNOLD F.A., McCLURE F.J. and WHILE C.L.: Sodium fluoride tablets for children. *Dent. Prog.* **1**: 8-12, (1960).

BARNAUD J.: La carie dentaire et sa prévention en Polynésie Française.

Médecine Tropicale **42**: 551-556, (1982).

BARNAUD J.:Carie dentaire, troisième fléau mondial (O.M.S.). Prévention absolue par les très hautes teneurs en fluor.

La Gazette Médicale (1989).

BARTELS M. and ARENDS J.: Adsorption of polyphosphonates on bovine enamel and hydroxyapatite. *Caries Res.* **13**: 218-226, (1979).

BATES R.G. and ACREE S.F.: H values of certain phosphate chloride mixtures and the second dissociation constant of phosphoric acid from 1 to 60 °C. *J.Res. Nat. Bur. Stnds.* **30**: 129-155, (1943).

BELTON D. and STUPP S.I.: Adsorption of ionizable polymers on ionic surfaces poly(acrylic)acid. *Macromol.* **16**: 7, (1983).

BIANCONI P.A., JUN LIN and STRZELECKI A.R.: Crystallization of an inorganic phase controlled by a polymer matrix.
Nature **349**: 315-317, (1991).

BIBBY B.J.: Preliminary reports on the use of sodium fluoride application in caries prophylaxis. *J. Dent. Res.* **21**: 314, (1942)

BIKALES M., OVERBERGER M.: Alkyleneimine polymers. in: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Vol. 1, 2nd Ed. John Wiley & Son, Inc. (1985).

BLAAKMER J., BÖHMER M.R., COHEN S.M.A. and FLEER G.J. Adsorption of weak polyelectrolytes on highly charged surfaces. Poly(acrylic) acid on polystyrene latex with strong cationic groups.
Macromol. **23**: 2301-2309, (1990)

BRATTHALL D.: Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus Mutans*.
Odont. Revue **21**: 143-152, (1970).

BONNER O.D.: A selectivity scale for some monovalent cations on Dowex 50. *J. Phys. Chem.* **58**: 318, (1954).

BROWN W.E., GREGORY T.M. and CHOW L.C.: Effects of fluoride on enamel solubility and cariostasis. *Caries Res.* **11** (Suppl. 1): 118-141, (1977).

CAMPBELL G.A., HAMILTON L.R. and PONTICELLO I.S.: Photographic applications of quaternary ammonium salt polymer. in *Polymeric amines and ammonium salts*. Goethals. Ed. Pergamon, IUPAC (1979).

CHANDER S. and FUERSTENEAU D.W.: Interfacial properties and equilibria in the apatite aqueous solution system.
J. Colloid Interface Sci. **70**: 506-516, (1979).

CHATANI Y., KOBATAKE T. and TADOKORO H.: Structural studies of poly(ethylenimine). 2. Double-stranded helical chains in the anhydrate. *Macromolecules* **15**: 170-176 (1982).

CHATANI Y., KOBATAKE T. and TADOKORO H.: Structural studies of poly(ethylenimine). 3. Structural characterization of anhydrous and hydrous states and crystal structure of the hemihydrate.

Macromolecules **16**: 199-104 (1983).

CHRISTIANSON D.D., PAULIS J.W. and WALL J.S.

Anal. Biochem. **32**, 35 (1968).

CHRISTOFFERSEN J., CHRISTOFFERSEN M.R.; and KJARGAARD N.: The kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite in water at constant pH.

J. Crystal Growth. **43**: 501-511, (1978).

CHRISTOFFERSEN J., and CHRISTOFFERSEN M.R.: Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite. II. Dissolution in non stoichiometric solution at constant pH. *J. Colloid Interface Sci.* **70**: 671-679, (1979).

CHRISTOFFERSEN J.: Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite. III. Nucleation controlled dissolution of polydisperse sample of crystals. *J. Crystal Growth* **49**: 29-44, (1980).

DAVIDSON C.L. and ARENDS J.: Thermal analysis studies on sound and artificial decalcified tooth enamel. *Caries Res.* **11**: 313-320, (1975).

DEAN H.T.: Endemic fluorosis and its relation to dental caries.

Publ. Hlth Rep. **53**: 1443, (1938).

DEAN H.T.: Fluorine in the control of dental caries.

Int. Dent. J. **4**: 311-337, 1954.

DERVICHIAN D.G.: Utilisation des substances amphiles où à activité superficielle. In *Techniques de laboratoires, chimie physique, chimie biologique*. T.1 Fasc.2. p. 787-799, Masson et C^{ie}, Ed. Paris, (1963).

DICK C.R. and HAM G.E.: Characterization of polyethylinimine.

J. Macromol. Sci. Chem. **A₄**: 1301, (1970).

DOW CHEMICAL CO.: P.E.I. polymers, Midland, Mich., (1974).

DOW CHEMICAL CO.: PEI. PEOX polymer: a unique water soluble thermoplastic that's expanding the horizons of new product development. Dow Chemical CO. Trade mark of Dow Chemical Co.(1985)

DRIESSENS F.M.C.: Mineral aspect of dentistry.

Ed. H.M. MYOS, Philadelphia, S. Karger, (1982).

EDGAR W.M., COCKBURN M.A. and JENKINS G.N.: Fluoride uptake and its inhibitory effects in oral microorganisms in culture.

Archs. Oral Biol. **2**: 615-623, (1981).

EVVA F.; and WISE, Z.: Photographic use of Polyethyleneimine.

Photochem. **52**, 136 (1958).

EVANI S. and KILLAT G.R.: U.S. Pat. 4,156,775 (1979).

FAWZI M.B., FOX J.L. DEDHIYA M.G. HIGUCHI W.I. and HEFFEREN J.J.: A possible second site for hydroxyapatite dissolution in acidic media.

J. Colloid Interface Sci. **67**: 304-311, (1978).

FERREL R. E., OLCOTT H.S. and FRAENKEL-CONRAT H.: Phosphorylation of proteins with phosphoric acid containing excess phosphorus pentoxide.

J. Am. Soc. **7**: 2101-2107, (1948).

FERRON A.: Bacteriologie médicale à l'usage des étudiants en Médecine. 13^{ème} édition, Ed. C.R. La Madeleine, (1989).

FERRUTI P.: Biomedical and pharmacological applications of tertiary amino polymers. in Polymeric amines and ammonium salts. Goethals. Ed. Pergamon, IUPAC (1979).

FISCHER R.B., MUHLER J.C. and WUST C.J.: The effects of several fluoride reagents upon the surface structure of powder enamel.

J. Dent. Res. **33**: 50-54, (1954).

FLOCK H.G. and RAUSCH E.G.: Water soluble polymers. in Polymer Sci. and Tech. **2**. Ed. Plenum Press, New York, London. (1973)

FRANK, J.W. and TENNENT D.M.: Composition for binding bile acids in vivo including cholesteremia. US Pat. 3,308,020 (1967).

FRANK R.M. and VOEGEL J.C.: Stages in the dissolution of human enamel in dental caries. *Calcif. Tiss. Res.* **24**: 19-27 (1977).

FRANKLIN T.J. and SNOW G.A.: Biochemistry and antimicrobial action.
and Hall LTD, London, (1971).

Chapman

GEROULD C.H.: Electron microscopic study of the mechanism of fluoride deposition in teeth. *J.Dent. Res.* **24**: 223-233, (1945).

GIBBONS R.J. and BANGHART S.B.: Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque.
Archs. oral Biol. **12**: 11-24, (1981).

GIBBONS R.J. and VAN HOUTTE J.: Bacterial adherence in oral microbial ecology.
An. Rev. Microbiol. **29**: 19-44, (1975).

GIBBONS R.J. and VAN HOUTTE J.: Bacteria adherence and the formation of dental plaque. In *Bacterial adherence*, Ed. Beachy E.H., Chapman and Hall, London, p. 63, (1980).

GRAMAIN Ph., VOEGEL J.C., GUMPPER M. and THOMANN J.M.: Surface properties and equilibrium kinetics of hydroxyapatite powder near the solubility equilibrium. *J. Colloid Interface Sci.* **118**: 148-157, (1987).

GRAMAIN Ph., THOMANN J.M., GUMPPER M. and VOEGEL J.C.: Dissolution kinetics of human enamel powder. I. Stirring effects and calcium accumulation. *J. Colloid Interface Sci.* **128**: 370-381, (1989).

GRAMAIN PH., REISS H., MAFE S. and MANZANARES J.A.: A model for the dissolution of calcium hydroxyapatite powder (sous presse *Ucla Chem. and Biochem.*)

GRAY J.A.: Kinetics of dissolution of human dental enamel in acid.
J. Dent. Res. **41**: 633-645, (1962).

GRIMA M.T.: Contribution à l'étude de la dissolution des apatites et effets inhibiteurs des polymères hydrosolubles.
Thèse 3^e Cycle, Strasbourg, (1985)

GUMPPER M.: Etude cinétique de la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite. Thèse, Université Louis Pasteur, Strasbourg, (1987).

HAMADA S. and SLADE H.D.: Biology, immunology and cariogenicity of streptococcus mutans. *Microbiol. Rev.* **44**, (1980).

HAMILTON I.R.: Biochemical effects of fluoride on oral bacteria.
J.Dent. Res. **69**: 660-667, (1990).

- HELFFERICH F.: Ion exchange. Mc Graw-Hill BOOK CO, New York, (1962).
- HERMANN U. and MUHLEMANN H.R.: Inhibition of salivary respiration and glycolysis by an organic fluoride. *Helv. Odont. Acta* **2**: 28, (1958).
- HIGUCHI W.I., GRAY L.A., HEFFERSEN J.J. and PATEL P.R.: Mechanism of dental dissolution in acid buffer. *J. Dent. Res.* **44**: 330-341, (1965).
- HIGUCHI W.I., PITHAYANUKEL, P. FOX J.L. and CHO P.W.: Adsorption on and surface chemistry of hydroxyapatite.
J. Colloid Interface Sci. **99**: 235, (1984).
- HORN D. and METZER J.: Fibre water interactions in paper making.
Transactions 6th Fundamental research symposium, Oxford **1**: 135-138, (1978).
- HORN D.: Polyethylenimine: physicochemical properties and applications. in Polymeric amines and ammonium salts. Goethlas, Ed. Pergamon, IUPAC, (1979).
- HOUWINK B. and WAGG B.J.: Effect of fluoride dentifrice usage during infancy upon enamel mottling of the permanent teeth.
Caries Res. **13**: 231-237, (1979).
- HOOVER M. F.: Some industrial applications of cationic quaternary polyelectrolytes.
J. Macromol. Sci. Chem. **A4**: 1327, (1970)
- HUMPHRIES M., JAWORZYN J.F. and CANTWELL J.B.: The effects of a range of biological polymers and synthetic surfactants on the adhesion of a marine *Pseudomonas* strains NCMB 2021 to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**: 299-308, (1986)
- HUMPHRIES M., NEMCEK J., CANTWELL J.B. and GERRARD J.J.: The use of graft copolymers to inhibit the adhesion of bacteria to a solid surface. *FEMS Microbiology Ecology* **45**: 297-304, (1987).
- JENNY J. and CONS N.C.: The role of culture for dental perception.
J. Dent. Res. **65**: 718, (1986).
- JOAO B.S., ZUMSTEIN R.M.G., ABUIN E., LISSI E.; and QUINA F.: Exchange between alkylammonium and sodium ions at the surface of dodecylsulfate micelle. *J. Colloid Interface Sci.* **135**(1) 238-245, (1990).

JORDAN T.H., WEI S.H.Y., BROMBERGER S.H. and KING J.C.: $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$, the product of the reaction between stannous fluoride and hydroxyapatite.

Archs Oral Biol. **16**: 241-246, (1971).

KLOTZ I. M., ROYER G. P. and SLONIEWSKY A.R.: Macromolecule-small molecule interactions. Strong binding and cooperativity in a model synthetic polymer. *Biochemistry* **8**: 4752-4756, (1969).

KOSMAS M. K.: Ideal polymer chain of various architectures at a surface. *Macromol.* **23**: 2061-2065, (1990).

KRESSMAN T.R.I. and KITCHENER J.A: Cation exchange with a synthetic phenolsulphonate resin. Part II. Equilibria with multivalent cations.

J. Chem. Soc.: 1201, (1949).

LECLERC H.: Microbiologie générale, 2^{ème} édition; Doin éditeur, Paris, (1981).

LEGEROS R.Z.: Apatites in biological systems.

Prog. Crystal Growth Charact. **4**: 1-45, 1981.

LEVICH V.G.: Physicochemical hydrodynamic. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, New Jersey, (1962).

LINDQUIST G.M. and STRATTON R.A.: The role of polyelectrolyte charge density and molecular weight on the adsorption and flocculation of colloidal silica with polyethylenimine.

J. Colloid Interface Sci. **56**(1): 45-58, (1976).

LINDSAY F.K. and D'AMINO J.S.: Operating characteristics of a strongly basic anion exchange. *Ind. Eng. Chem.* : 1085, (1951).

LINGE H.G. and NANCOLLAS G.H.: A rotating disc study of the dissolution of dental enamel. *Calc. Tissue Res.* **12**: 193-208, (1973).

LUDWICK A.G. and OVERBERGER C.G.: Synthesis and characterization of polyethylenimine backbone polynucleotide models.

J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. **20**: 2132 (1982).

MARCHISIO C., SBERTOLI G., FARINA P. and FERRUTI P.:

Europ. J. Pharmacol. **12**: 236, (1970)

MARGOLIS H.C. and MORENO E.C.: Kinetic and thermodynamic aspect of enamel demineralization. *Caries Res.* **19**: 22-35, (1985).

- MARTHALER T.M.: Caries inhibition after seven years of unsupervised use of amine fluoride dentifrice. *Brit. Dent. J.* 124: 510, (1968)
- McCANN H.G.: The solubility of fluoroapatite and its relationship to that of calcium fluoride. *Archs Oral Biol.* 13: 987-1001, (1968).
- MORENO E.C., GREGORY T.M.; and BROWN W.E.: Preparation and solubility of hydroxyapatite. *J. Res. Natl. Bur. Stnds.* 72(A): 773-782, (1968).
- MORENO E.C., KRESAK M. and ZAHRADNIK R.T.: Physicochemical aspects of fluoride apatite systems relevant to the study of dental caries. *Caries Res.* 11: Suppl., 142-171, (1977)
- MOROSON H. and ROTMAN M.: Polyelectrolytes and their applications. Ed. A. Rembaum and Sélégny, D. Reidel. Dordrecht-Holland, (1975).
- MÜHLEMANN H.R., SCHMID H. and KÖNIG K.G.: Enamel solubility reduction with inorganic and organic fluorides. *Helv. Odont. Acta* 1: 23-33, (1957).
- MÜHLER J.C. and HUYSSEN G. Van: Solubility of enamel protected by sodium fluoride and other compounds. *J.Dent. Res.* 26: 119-127, (1947).
- MYERTHAL D.L. and THOMAS T.H.: Kinetics of adherence of actinomyces viscosus to saliva coated silica and hydroxyapatite beads. *J. General Microbiology* 129: 1387-1395, (1983).
- NIMS I.f.: The first dissociation constant of phosphoric acid from 0 to 50 °C. *J. Am. Chem.* 56: 1110-1112, (1934).
- OSUJIS O.O., LEAKE J.L. and CHIPMAN M.L.: Risks factors for dental fluorosis in fluoridated community. *J. Dent. Res.* 67: 1488-1492, (1988).
- OVERBERGER C. G. and MORICHIMA Y. Circular dichroism of polyethylenimine containing optically active thymine derivatives and grafted pendants. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 18: 1268 (1980).
- PEARCE E.I.F.: Ion displacement following the adsorption of anionic macromolecules on hydroxyapatite. *Calcif. Tiss. Int.* 33: 396-402, (1981)

PELLERIN Cl. et PELLAT B.: Biochimie Odonto-Stomatologique. Masson Ed. Paris, (1986).

PERCH B., KJEMS E. and RAVN T.: Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources.

Acta Path. Microbiol. Scan. **82**: 357-370, (1974).

PRADIP, ATTIA Y.A. and FUERSTENEAU D.W.: The adsorption of polyacrylamide flocculants on apatite.

Colloids & Polymer Sci. **258**: 1343-1353 (1980).

RIVAS B.L., MATURANA H.A., PERICH I.M. and ANGE U.: Polyethyleneimine supports for resins with retention properties for heavy metals. Part I. *Polymer Bulletin* **14**: 239-243 (1985)

ROBINSON R.R. and STOKES R.M.: Electrolyte solutions. Butterworths, London, (1959)

ROLLA G., IVERSON O.J. and BONESVOLL D.W.: Lipoteichoic acid- the key to adhesiveness of sucrose grown *Streptococcus mutans*, in McGhee, J.Mestecky, and J.L. Babb (ed.), Secretary immunity and infection. Plenum Publisher Corp.; New York (1978).

ROSEMAN T.J., HIGUCHI W.I., HODES B. and HEFFERREN J.J.: The retardation of enamel dissolution rates by adsorbed long-chain ammonium chloride. *J. Dent. Res.* **48**: 509-520 (1969)

ROSENBERG M., ROSENBERG, E., JUDES H. and WEISS E.: Bacterial adherence to hydrocarbone and to surfaces in the oral cavity.

FEMS Microbiology Letters **20**: 1-5 (1980)

SAEGUSA T, KOBAYASHI S. and KEIZA H.: Preparation and chelating properties of mercaptoethylated and dithiocarboxylated poly(styrene-g-ethylenimine)s. *Polym. J.* **10**: 403 (1978)

SCHMITT A.: Macromolécules aux interfaces; adsorption à l'interface solide/liquide. in: *Colloides et interfaces*, 245-288, les Ed. de Physique (1983).

SCHOLLER M.: Etude antigénique de *Streptococcus sanguis*, mise en évidence, purification, caractérisation chimique et immunologique d'antigènes communs à diverses bactéries de la cavité buccale.

Thèse doctorat ès-Sciences, Strasbourg (1982).

SHIMABAYASHI S., TANAKA H. and NAKAGAKI M.: Adsorption of dodecylammonium ion on hydroxyapatite and concurrent release of phosphate and calcium ions from the surface of hydroxyapatite.

Chem. Pharm. Bull. **35**(9): 2539-2546 (1987) a.

SHIMABAYASHI, S.; TANAKA, H.; and NAKAGAKI, M.: Adsorption of cetylpyridinium and cetyltrimethylammonium ions on hydroxyapatite and concurrent release of phosphate and calcium from the surface of hydroxyapatite. *Chem. Pharm. Bull.* **35**(12): 4687-4694 (1987) b.

SMIT W. L.: (to Dow chemical Co.); U.S. Pat. 4,153,466 (1979)

STEPHAN R.M.: Changes in hydrogen ion concentration on tooth surfaces and in caries lesions. *J. Am. Dent. Ass.* **27**: 716-723 (1940)

TANAKA R., ISAO U., TAKAKI Y., KAZUYA K.; and SAITO S.: High molecular weight linear poly(ethyleneimine) and poly(N-methylation).

Macromolecules **16**: 849-853 (1983)

TEDERESCO L. A. and ALBINO J. E.: Psychological meanings of facial appearance. *J. Dent. Res.* **65**: 719 (1986)

THOMANN J.M., VOEGEL J.C., GUMPPER M. and GRAMAIN Ph.: Dissolution kinetics of human enamel powder. II. A model based on the formation of a self-inhibiting surface layer.

J. Colloid Interface Sci. **132**: 403-412 (1989)

THOMANN J.M.; Mécanisme de dissolution d'une apatite de synthèse. Modélisation et application à l'inhibition par adsorption de polymères. Thèse doctorat d'Université, Strasbourg (1989).

THOMANN J.M., GASSER P., BRES E., VOEGEL J.C. and GRAMAIN Ph.: Development of an automatized experimental set up for the study of ionic exchange kinetics. Application to the ionic adsorption, adsorption attainment and dissolution of apatite compounds.

Comput. Method program Biomed. **31**: 89-35 (1990).

THOMANN J.M.; VOEGEL J.C. and GRAMAIN Ph.: Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite powder. IV. Interfacial calcium diffusion controll process. *Colloids and Surfaces* **54**: 145-159 (1991).

TISELIUS A., HJERTEN S. and LEVIN O.: Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch. Biochem. Biophysics* **65**: 132-139 (1956)

TOMALIA D. A., DICKERT Y. J. and McCARTY L. P.: Treating poison ivy dermatitis using certain polyamines and polytertiaryamides.

U.S. PAT. 4,112,067 (1978)

TREWEEK G. P. and MORGAN J.: Polymer flocculation of bacteria. The mechanism of *E. coli* aggregation by polyethyleneimine.

J. Colloid Interface Sci. **60**(2): 258-272 (1977).

TSUCHIDA E.: Interaction of polycations with erythrocyte membranes and their application as a reagent for cell fusion. in: *Polymeric amine and ammoniums salts*; by Goethals, Pergamon Press, IUPAC (1979)

TURESKY S., GLICKMAN I.; and SANDBERG R.: In vitro chemical inhibition of plaque formation. *J. Periodontol.* **43**: 236 (1973)

WHITE D.J. and NANCOLLAS G.H.: Physical and chemical considerations of the role of firmly and loosely bound fluoride in caries prevention.

J. Dent. Res. **69** (Spec.Issue) 587-594 (1990)

WHITE W. and NANCOLLAS G. H.: Quantitative study of enamel dissolution under conditions of controlled hydrodynamics.

J. Dent. Res. **56**: 524-530 (1977).

WU M. S., HIGUCHI W. I., FOX J. L. and FRIEDMANN M.: Kinetics of hydroxyapatite crystal dissolution in weak acid buffers using the rotating disk method. *J. Dent. Res.* **54**: 496-505 (1976).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
DISSOLUTION DE L'HYDROXYAPATITE	5
I-1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6
I-1.A. Les modèles de dissolution	6
I-1.B. Inhibition de la dissolution des apatites	9
I-2. PRESENTATION DU MODELE DEVELOPPE DANS NOTRE LABORATOIRE	10
I-3. CARACTERISTIQUES D'UN INHIBITEUR "IDEAL"	21
CHAPITRE II	
SYNTHESE DES POLYMERES	22
INTRODUCTION	23
II.1. SYNTHESE DES POLY(ETHYLENEIMINES) (PEI) LINEAIRES	24
II-1.A. Les PEI	24
II-1.A.1. Mode opératoire	24
II-1.A.2. Résultats	25
II-1.A.3. Propriétés des PEI linéaires	26
II-1.B. Synthèse des chlorhydrates de PEI	27
II-1.B.1. Mode opératoire	27
II-1.B.2. Résultats	27
II-1.C. Synthèse des fluorhydrates de PEI	28
II-2. ALKYLATION ET FONCTIONNALISATION DES PEI	29
II-2.A. Monométhylation de la PEI ^{ccc}	29
II-2.A.a. Mode opératoire	29
II-2.A.1. Synthèse du chlorhydrate de PEI N-méthylée	30
II-2.A.2. Synthèse du fluorhydrate de PEI N-méthylée	30
II-2.A.b. Résultats	30
II-2.B. Greffage d'une chaîne paraffinique sur la PEI	31

II-2.B.a. Mode opératoire	32
II-2.B.1. Synthèse du chlorhydrate	32
II-2.B.2. Synthèse du fluorhydrate	32
II-2.B.b. Résultats	32
II-2.C. N-acétylation de la PEI	33
II-2.C.a. Mode opératoire	34
II-2.C.1. Synthèse du chlorhydrate	34
II-2.C.2. Synthèse du fluorhydrate	34
II-2.C ₂ . Résultats	34
II-3. QUATERNISATION FONCTIONNELLE DE LA PEI	35
II-3.A. Synthèse de la (N,N-diméthyl) PEI quaternaire	36
II-3.A.a. Mode opératoire	36
II-3.A.b. Résultats	37
II-3.B. Synthèse de poly (N,N-méthyl acétyl) PEI quaternaire	37
II-3.B.a. Mode opératoire	38
II-3.B.b. Résultats	38
II-3.C. Synthèse de poly(N,N-méthyl éthanol phosphate) PEI quaternaire	39
II-3.C.a. Mode opératoire	39
II-3.C.a.1. Greffage du bromo-éthanol sur la PEI.Me	40
II-3.C.a.2. Phosphorylation	40
II-3.C.b. Résultats	41
II-4. SYNTHÈSE DES COPOLYMERES DE PEI QUATERNISES DE STRUCTURE HETEROGENE	42
CONCLUSION	46
CHAPITRE III	
MATERIEL ET METHODES	47
III-1. MATERIEL	48
III-1.A. Montage expérimental	48
III-1.A.1. Le réacteur	49
III-1.A.2. Les instruments de mesure	49
III-1.A.3. Le dispositif d'enregistrement	51
III-1.B. L'hydroxyapatite	52
III-1.C. Les solutions	53
III-1.C.1. Solution de dissolution "D"	53
III-1.C.2. Solutions d'étalonnage "D" et "E"	55
III-1.C.3. Solutions d'ajustage des pH	55

III-2. METHODES	56
III-2.A. Préparation des solutions de polymères	56
III-2.B. Protocole expérimental	58
III-2.B.1. La phase de stabilisation	58
III-2.B.2. La phase de mise à l'équilibre	58
III-2.B.2.A. L'adsorption des polymères	59
III-2.B.3. La phase de dissolution	60
III-2.B.4. Etalonnage de l'électrode de calcium	62
III-2.B.5. Evaporation	63
III-2.C. Exploitation des données	65
III-2.C.1. Volume d'acide nécessaire pour le saut de pH	65
III-2.C.2. Consommation de protons	67
III-2.C.3. Libération de calcium	67
III-2.C.4. Fluorures en solution	68

CHAPITRE IV

EFFETS INTRINSEQUES DES POLYMERES SUR LE PROCESSUS DE DISSOLUTION DE L'HYDROXYAPATITE

	69
IV-1. CINETIQUES DE REFERENCE à pH 5	71
IV-1.A. Consommation des protons et libération de calcium	71
IV-1.B. Le rapport de congruence	72
IV-1.C. Quantification de l'inhibition	72
IV-1.D. Conclusion	73
IV-2. EFFETS INTRINSEQUES DES POLYMERES SUR LA DISSOLUTION	73
IV-2.A. Influence des polymères sur la mise à l'équilibre	74
IV-2.B. Les PEI linéaires: effet de la masse moléculaire	78
IV-2.C. Effets de l'alkylation des polymères	80
IV-2.D. Effets de la fonctionnalisation des polymères	84
IV-2.D.1 Effets de la carboxylation de PEI.Me	85
IV-2.D.2 Effets de la phosphorylation de PEI.Me	86
IV-2.D.3 Comparaison des effets de la fonctionnalisation	87
IV-2.E. Effets des polymères de structure hétérogène	89
IV-2.E.1 Effets de l'association carboxyle-alkyle	90
IV-2.E.2 Effets de l'association phosphonate alkyle	92
IV-2.E.3 Comparaison des effets de PEI.MOR 1 et PEI.CHER 1	93

IV-2.E.4 Influence de la concentration de PEI.CHER 1 sur le processus de dissolution de l'hydroxyapatite	94
IV-2.F. Discussion	97
IV-2.G. Conclusion	97

CHAPITRE V

INTREFFERENCES DES POLYMERES COUPLES AUX IONS FLUORURES AVEC LA DISSOLUTION DE L'HYDROXYAPATITE

V-1. INFLUENCE DES POLYMERES COUPLES AUX IONS FLUORURES SUR LA MISE A L'EQUILIBRE	100
V-2. EFFETS DU COUPLAGE POLYMERES – IONS FLUORURES SUR LA DISSOLUTION DE L'HYDROXYAPATITE	103
V-2.00 Evolution des fluorures en solution	104
V-2.01 Action du fluorure de sodium sur la dissolution	106
V-2.A Effets du couplage PEI linéaires – fluorures	107
V-2.B. Effets du couplage PEI alkylées – fluorures	109
V-2.C. Effets du couplage PEI de structure hétérogène-fluorures	111
V-2.D. Discussion	114
V-2.E. Conclusion	115

CHAPITRE VI

INTERACTIONS POLYMERES – BACTERIES CARIOGENES

VI-1. POLYMERES et ADHERENCE BACTERIENNE SUR L'APATITE	119
VI-1.A. Matériel et méthodes	120
VI-1.A.1. Matériel	120
VI-1.A.1.a. Polymères et hydroxyapatite	120
VI-1.A.1.b. Les bactéries	120
VI-1.A.1.c. La salive totale	121
VI-1.A.1.d. Appareillage	121
VI-1.A.2. Méthodes	122
VI-1.B. Résultats	123
VI-1.B.1. Adhérence des bactéries en présence de salive	123
VI-1.B.2. Polymères et adhérence bactérienne	123
VI-1.B.3. Interprétation	124
VI-1.B.4. PEI.CHER-salive totale et adhérence de <i>s.mutans</i> OMZ175	126

VI-2. POLYMERES ET CROISSANCE BACTERIENNE	128
VI-2.A. Méthode d'étude	128
VI-2.A.1. Mode opératoire	129
VI-2.A.2. Résultats	129
VI-2.A.2.1. La culture témoin	129
VI-2.A.2.2. Effets intrinsèques des polymères sur la croissance	130
VI-2.A.2.3. Effets du couplage aux ions F ⁻	131
VI-2.A.2.3.a. Effet de la PEI.MOR 2	131
VI-2.A.2.3.b. Effet de PEI.CHER 2	132
VI-2.A.2.3.c. Comparaison des effets de couplage au F ⁻	133
VI-2.B. Interprétation	133
VI-3. CONCLUSION	135
CHAPITRE VI	
TOXICOLOGIE DES PEI	
	136
VII-1. APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES PEI	137
* Industrie du papier	137
* Traitement des eaux	137
* Industrie minière	137
* Industrie textile	138
* Photographie	138
* Industrie du triage	138
* Les tensioactifs	138
VII-2. APPLICATION BIOMEDICALES DES PEI	138
* Onco-hématologie	139
* Hépatologie	139
* Enzymologie	139
* Dermatologie	140
* Cytologie	140
* Toxicité aigüe	140
VII-3. CONCLUSION	140
CONCLUSION	141
BIBLIOGRAPHIE	145