



Adsorption des acides aminés essentiels et leur mélange sur l'hydroxyapatite mal cristallisée (Adsorption of some essential amino acids and their mixture onto poorly crystalline hydroxyapatite)

A. El Rhilassi, M. Mourabet, H. El Boujaady, M. Bennani Ziatni, R. El Hamri, A. Taitai
Chimie et Valorisation des Phosphates Inorganiques, Département de Chimie, Faculté des Sciences, 1300 Kenitra, Morocco

Received 3 Nov 2013, Revised 20 June 2014, accepted 20 June 2014

**Corresponding Author. E-mail: aelrhilassi@gmail.com; Tel: (+2120662131372)*

Abstract

The adsorption of L-Lysine, DL-Leucine, two essential amino acids, and their equimolar mixture onto poorly crystalline hydroxyapatite, obtained by precipitation, is studied. The adsorption kinetics is relatively fast. Isotherms were established, they are of Freundlich and Langmuir type. The affinity constant is more important for the L-lysine than for the DL-leucine. The amount of adsorbate adsorbed decreases with the increase of ratio Ra (mg/ml). The calcium ions increase the adsorption, while phosphate ions inhibit it. The lateral load of the amino acid can modify the adsorption characteristics. The thermodynamic study shows that the adsorption is a spontaneous and exothermic process. The interactions adsorbate-adsorbent are electrostatic type.

Key words: Adsorption, L-lysine, DL-leucine, Hydroxyapatite

Résumé

Ce travail porte sur l'étude de l'adsorption des deux acides aminés essentiels : L-lysine et DL-leucine et de leur mélange sur l'hydroxyapatite déficiente, obtenue par précipitation. La cinétique d'adsorption est relativement rapide. Les isothermes d'adsorption ont été établies, ils sont de type Freundlich et Langmuir. La constante d'affinité est plus importante pour la L-lysine que pour la DL-leucine. La quantité adsorbée à l'équilibre diminue avec l'augmentation du rapport Ra (mg/ml). L'ajout des ions HPO_4^{2-} dans le milieu d'incubation réduisent l'adsorption d'acides aminés, alors que les ions Ca^{2+} ont un effet inverse. La charge latérale de l'acide aminé peut modifier les caractéristiques d'adsorption. L'étude thermodynamique montre que l'adsorption est un processus spontané et exothermique. Les interactions adsorbate-adsorbant sont de type électrostatique.

Mots clés : Adsorption, L-lysine, DL-leucine, Hydroxyapatite

1. Introduction

Le processus d'adsorption a reçu une attention particulière ces dernières vingt années en raison des applications potentielles dans différents domaines (biologie, géologie, minéralogie, processus de traitement,...). Les apatites phosphocalciques sont des adsorbants les plus appropriés pour ce type d'études. Ainsi, l'hydroxyapatite, le prototype minéral des tissus durs (os et dents), a été largement utilisée comme biomatériaux pour le remplacement des os défectueux [1-2], comme support de molécules biologiques et d'administration de médicaments de drogues [3-4] et comme système de libération de principes actifs [5-6]. Une caractéristique majeure des apatites mal cristallisées, fraîchement précipitées, est la présence d'environnements ioniques qui n'existent pas dans les apatites bien cristallisées. Ces environnements ont été attribués à la présence en surface des cristaux d'une couche hydratée bien organisée, mais labile, contenant des ions minéraux (des ions phosphate, hydrogénophosphate et calcium) [7-8]. L'hydroxyapatite mal cristallisée, est aisément préparé dans un milieu aqueux par une précipitation rapide à température ambiante et à pH neutre. Il possède les caractéristiques des apatites biologiques au niveau de la microstructure (taille et morphologie des cristallites), de la surface spécifique, de la composition chimique ainsi qu'à la présence d'une couche hydratée à leur surface. Ces caractéristiques confèrent à ce matériau d'être analogue à la phase minérale des tissus calcifiés.

Il est intéressant de noter que la composition de l'hydroxyapatite phosphocalcique peut varier dans un domaine dont le rapport atomique Ca/P est compris entre 1.5 et 1.67. En fait, seule l'hydroxyapatite de rapport

1.67 est stœchiométrique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, les autres apatites sont appelées apatites déficientes. Plusieurs formules chimiques ont été proposées pour l'hydroxyapatite déficiente en calcium (CDHA) [9-11]:

$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$). Dans le cas limite ($x=1$, $\text{Ca/P}=1,5$), la formule chimique de CDHA se présente comme suit: $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$.

Dans le présent manuscrit, nous nous proposons d'étudier les propriétés d'adsorption des acides aminés essentiels, la L-lysine et la DL-leucine, et leur mélange équimolaire par l'hydroxyapatite déficiente en calcium (CDHA) de structure apatitique, mal cristallisée. Nous nous proposons également d'examiner l'influence de la composition du milieu d'incubation sur les réactions d'adsorption d'acides aminés en y introduisant des ions calcium et phosphate. Cette approche nous permet de préciser le rôle de ces ions et d'expliquer les éventuelles interactions qui ont lieu entre la solution et la surface de l'apatite. L'influence du rapport R_a (mg/ml) = masse du solide/volume de la solution sur le processus d'adsorption a été également étudié. Une étude thermodynamique a été effectuée afin de préciser, d'une part, la nature du processus d'adsorption, et, d'autre part, le type d'interaction adsorbat- adsorbant. Il nous a paru aussi important de voir dans quelle mesure la présence de la charge latérale de l'acide aminé peut modifier les caractéristiques d'adsorption. En outre, les caractérisations de l'hydroxyapatite ont été faites en utilisant les analyses de diffraction de rayons X (DRX), microscopie électronique à balayage (MEB) et la spectroscopie d'absorption infrarouge FTIR.

2. Matériaux et méthodes

2.1. Adsorbant

L'hydroxyapatite de calcium a été synthétisée par co-précipitation selon la méthode décrite par Rey et coll. [12]. Une solution du nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Riedel- de Haën -Allemagne) (35.4g dans 0.5l d'eau distillée) a été versé immédiatement à température ambiante dans une solution de di-ammonium hydrogenophosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Riedel- de Haën- Allemagne) (34.8g dans 1l d'eau distillée), le pH de la solution a été ajusté à 7 par une solution d'ammoniaque concentrée. Après lente agitation pendant 2h, la suspension a été filtrée, lavée avec l'eau distillée, séchée 48 h à 70°C, broyée et tamisée.

Les précipités ont été caractérisés par analyse chimique (dosage du calcium par complexométrie en retour et du phosphore par colorimétrie du complexe jaune phosphovanadomolybdique), diffraction des rayons X, spectroscopie d'adsorption infrarouge après dispersion dans KBr (1.5mg/300mg) à l'aide d'un VERTEX 70/70v FT-IR et par microscopie électronique à balayage (MEB).

2.2. Adsorbats

L-Lysine et DL-leucine sont deux des neuf acides aminés essentiels, non synthétisés par le corps humain, ils doivent donc être apportés par l'alimentation [13-14]. Chacun d'eux représente environ 8% des acides aminés des protéines du corps humain. Les caractéristiques et les propriétés de ces acides aminés [15-16] sont illustrées dans le *tableau 1*.

Tableau 1 : Caractéristiques et propriétés de la L-Lysine et la DL-leucine.

acide aminé	L-lysine	DL-leucine
structure chimique	$\text{H}_3\text{N}^+ - (\text{CH}_2)_4 - \underset{\substack{ \\ \text{NH}_3^+}}{\text{CH}} - \text{COO}^-$	$\text{CH}_3 - \underset{\substack{ \\ \text{CH}_3}}{\text{CH}} - \text{CH}_2 - \underset{\substack{ \\ \text{NH}_3^+}}{\text{CH}} - \text{COO}^-$
formule moléculaire	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$
autres noms	2,6-diaminohexanoïque	2-amino-4-méthylpentanoïque
hydrophobicité	fortement basique et hydrophile	très hydrophobe
acidité (pK_a)	2,18 (carboxyle), 8,95 (amino), 10.53 (chaîne latérale)	2.36 (carboxyle), 9.60 (amino)
poids moléculaire (g/mol)	146.19	131.17
pH isoélectrique	9.74	6.04
solubilité dans l'eau à 25 °C (g/L)	1500	24

2.3. Protocole expérimental

Tous les essais d'adsorption ont été réalisés selon une méthode décrite précédemment [17]. Elle consiste à ajouter à 200 mg d'apatite en poudre, placé dans un tube à essai, 10 ml d'une solution d'adsorbat (L-lysine, DL-leucine ou mélange équimolaire de ces deux acides aminés) de concentration comprise entre 0.1 et 50 mmol/l. Après agitation d'une minute, l'ensemble est placé dans un bain thermostaté à température physiologique 37°C. A des temps donnés, le solide a été séparé de la solution par filtration à l'aide d'un verre fritté puis séché à l'étuve à 80° pendant une nuit. La quantité de l'acide aminé adsorbé par l'apatite est calculée à l'aide de l'équation (1) :

$$Q_{ads} = \frac{V(C_o - C_{eq})}{m} \quad (1)$$

Où Q_{ads} est la quantité adsorbée à l'équilibre ($\mu\text{mol/g}$), C_o et C_{eq} sont respectivement la concentration d'acide aminé avant et après adsorption dans la solution ($\mu\text{mole/l}$), V est le volume de la solution (l) et m la masse du solide mis en suspension (g).

Les concentrations à l'équilibre " C_{eq} " ont été déterminées par un dosage colorimétrique à la ninhydrine [18] à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS type GBC 911A à 570nm. Ce dosage consiste à ajouter, dans un tube à essai, 1ml de la solution à 1ml de réactif (constitué de 2g de ninhydrine dissoute dans 75ml de DMSO, de 150mg de l'hydrindatine et de 25ml d'acétate de lithium à 4moles/l). Le mélange est agité puis porté dans un bain marie bouillant pendant 15 minutes. Une coloration violette se développe. Après refroidissement on ramène l'ensemble à 50 ml et on mesure l'absorbance de la solution obtenue. Après adsorption, les échantillons ont été étudiés par analyse chimique (dosage calcium et du phosphore) et par spectroscopie d'absorption infrarouge (FTIR).

3. Résultats et discussion

3.1. Etude de la solution

3.1.1. Cinétique d'adsorption

La durée de contact adsorbant-adsorbat nécessaire pour atteindre l'équilibre a été déterminée à la température physiologiques ($T = 37^\circ\text{C}$) avec une concentration initiale en adsorbat ($C_o = 1 \text{ mmol/l}$). L'évolution de la quantité d'adsorbat adsorbée a été reportée en fonction de la durée d'incubation (figure 1). L'équilibre d'adsorption est atteint environ 1heure de contact pour la L-lysine et 3 heures pour la DL-leucine et le mélange équimolaire de ces deux acides aminés, ce qui atteste d'une cinétique rapide du processus de fixation. Ce résultat est en accord avec des travaux antérieurs [17] et [19-20]. L'essentiel de la réaction de fixation a eu lieu après 15 minutes d'incubation seulement. Notons aussi que la quantité la plus importante d'adsorbat adsorbée à l'équilibre est celle de la L-lysine ; l'acide aminé le plus polaire. Nous constatons également que le pH des solutions surnageant après adsorption, pour différents adsorbats, diminue légèrement avec le temps, il passe environ de 5,6 à 5,3 pour un intervalle de temps compris entre 15 mn et 24 h (tableau 2).

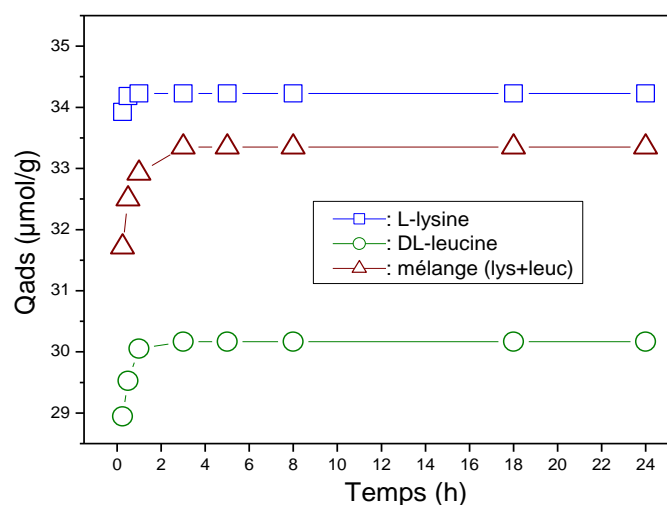


Figure 1 : Cinétiques d'adsorption à 37°C.

Tableau 2 : pH de la solution surnageant après adsorption d'acide aminé en fonction du temps à 37°C.

Temps (h)	L-lysine	DL-leucine	Mélange (lys+leuc)
0,25	5,57	5,59	5,6
0,5	5,52	5,57	5,53
1	5,47	5,49	5,49
3	5,47	5,46	5,46
5	5,37	5,43	5,4
8	5,34	5,37	5,36
18	5,27	5,32	5,29
24	5,24	5,29	5,26

3.1.2. Isothermes d'adsorption

L'étude des isothermes d'adsorptions a été réalisée à 37°C pour une durée de contact égale à 18 heures et avec des solutions en adsorbats de concentrations couvrant la gamme de 0 à 50mmol/l, comme dans des études antérieures [17]. La quantité absorbée Q_{ads} ($\mu\text{mol/g}$) en fonction de la concentration dans la solution à l'équilibre (*figure 2*), montre que l'adsorption est de type I (adsorption en monocouche). Afin d'étudier le pouvoir adsorbant de l'hydroxyapatite synthétisée, nous avons appliqué les modèles de Langmuir et de Freundlich [21,22], les *figures 3 et 4* montrent les isothermes correspondantes à ces deux modèles.

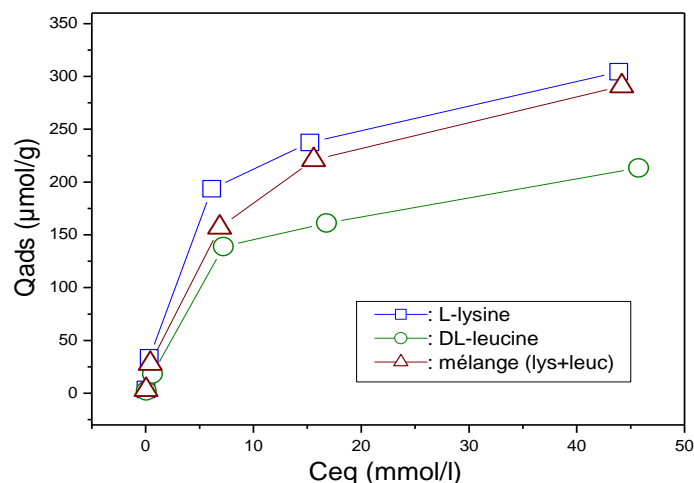


Figure 2 : Isothermes d'adsorption des adsorbats sur l'hydroxyapatite déficiente.

Isothermes de Langmuir

Les constantes caractéristiques de l'adsorption, à savoir la capacité maximale adsorbée à la saturation Q_{∞} ($\mu\text{mol/g}$) et la constante de Langmuir d'interaction adsorbant-adsorbant b (l/mol) sont déterminés à partir de l'équation de Langmuir linéarisée:

$$\frac{C_{eq}}{Q_{ads}} = \frac{C_{eq}}{Q_{\infty}} + \frac{1}{bQ_{\infty}} \quad (2)$$

Où Q_{ads} ($\mu\text{mol/g}$) est la quantité d'adsorbant adsorbée à l'équilibre et C_{eq} (mmol/l) sa concentration à l'équilibre. On peut alors déduire respectivement Q_{∞} et b à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine des courbes $C_{eq}/Q_{ads} = f(C_{eq})$ (*figure 3*). Les résultats obtenus (*tableau 3*) indiquent que la constante d'affinité b est pratiquement deux fois plus importante pour la L-lysine que pour la DL-leucine, ce qui est en accord avec nos résultats précédemment publiés [17] sur les apatites mal cristallisées de rapport Ca/P comprise entre 1.33 et 1.67. La valeur observée de Q_{∞} dans le cas de la L-lysine est supérieure à celle constatée dans le cas de la DL-leucine. Notons également que les valeurs des constantes Q_{∞} et b obtenues dans le cas du mélange équimolaire

des deux acides aminés sont inférieures à celles de la L-lysine et supérieure à celles de la DL-leucine. En comparant les valeurs de ces constantes à celles des travaux antérieurs [17] et [20], nous constatons qu'elles dépendent du couple adsorbat-adsorbant.

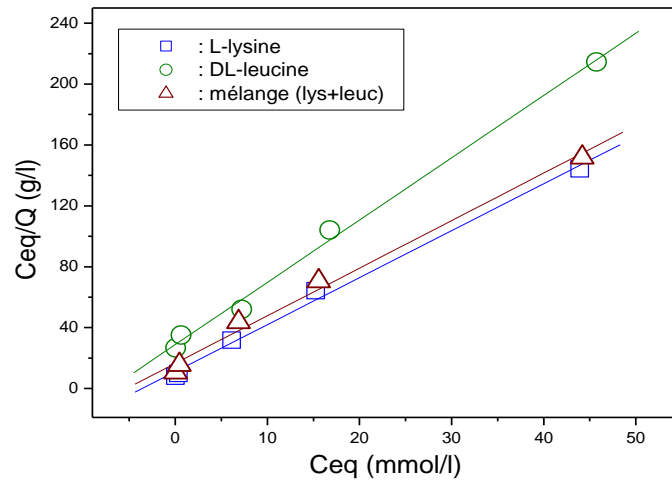


Figure 3 : Transformées linéaires des isothermes de Langmuir à 37°C.

Isothermes de Freundlich

L'équation empirique de Freundlich bien adaptée pour décrire l'équilibre en phase aqueuse est sous la forme:

$$Q_{ads} = a C_{eq}^m \quad (3)$$

Où Q_{ads} et C_{eq} ont les mêmes définitions que ci-dessus, a (l/g) et m sont des constantes de Freundlich. Cette équation a été exploitée sous sa forme linéaire:

$$\text{Log}(Q_{ads}) = \log(a) + m \cdot \log(C_{eq}) \quad (4)$$

Les courbes $\text{Log}(Q_{ads}) = f(\log C_{eq})$ (figure 4) ont conduit aux valeurs de a et de m (tableau 3). Les résultats obtenues montrent que la valeur de la constante d'affinité a est deux fois plus importante pour L-lysine que dans le cas de la DL-leucine, ces résultats se rapprochent de ceux déduits de la constante d'affinité de Langmuir b . Les valeurs de m sont comprises entre 0.62 et 0.71. Nous constatons également que les valeurs de ces constantes dépendent aussi de la nature du couple adsorbat-adsorbant [23].

Les courbes $C_{eq} / Q_{ads} = f(C_{eq})$ (figure 3) et les courbes $\text{Log}(Q_{ads}) = f(\log C_{eq})$ (figure 4) sont des droites dont le coefficient de régression est respectivement égal à 99.76 et 98 (tableau 3) : l'adsorption obéit aux deux modèles de Langmuir et celui de Freundlich.

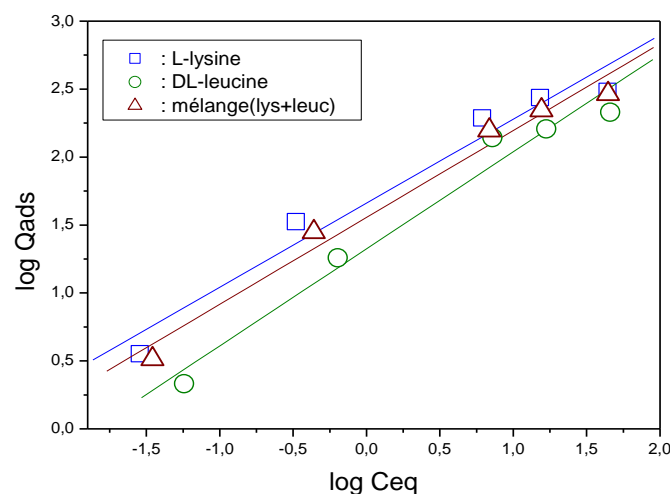


Figure 4 : Transformées linéaires des isothermes de Freundlich à 37°C.

Tableau 3 : Valeurs des paramètres du modèle de Langmuir et de Freundlich.

Modèle	Paramètre	L-lysine	DL-leucine	Mélange
Langmuir	Q_{∞} ($\mu\text{mol/g}$)	324.02	244.36	320.01
	b (l/mol)	278.22	141.94	188.99
	R^2 (%)	99.76	99.78	99.59
Freundlich	m	0.62	0.71	0.64
	a (l/g)	45.75	21.12	36.12
	R^2 (%)	98.00	98.41	98.88

3.2. Etude du solide

Les analyses chimiques ont montré que l'apatite synthétisée est déficiente en calcium ; son rapport atomique Ca/P est de 1.59, qui est inférieure à celle de l'hydroxyapatite stoechiométrique (1,67). Leur surface spécifique est de l'ordre de $137 \text{ m}^2/\text{g}$. La *figure 5* représente des micrographies à trois grossissements ($\times 1000$, $\times 2000$ et $\times 4000$). Elle montre des particules de formes irrégulières à différentes tailles ; ce qui atteste la basse cristallinité de l'hydroxyapatite synthétisée. La diffraction des rayons X de l'adsorbent (*figure 6*) montre des raies larges et mal résolues caractéristiques d'une apatite mal cristallisée similaire à la phase minérale du tissu osseux.

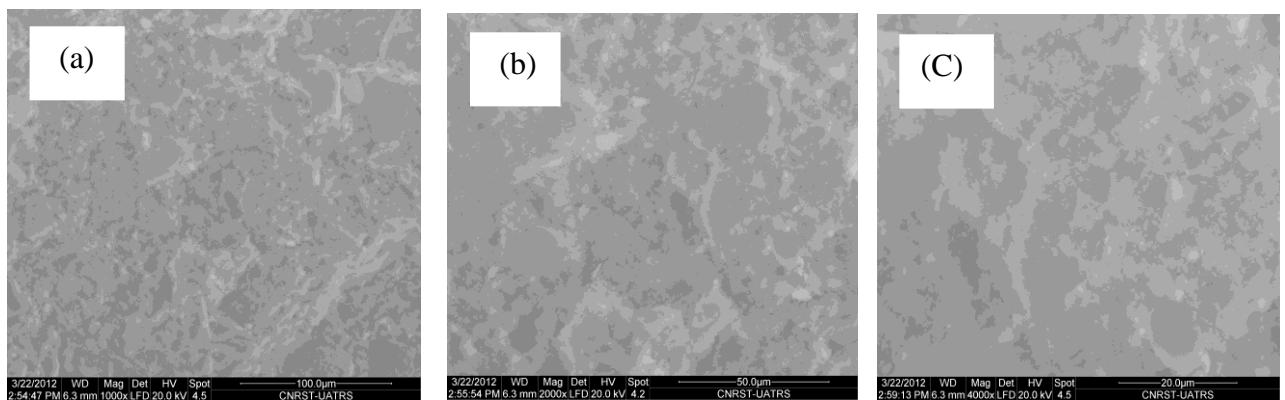


Figure 5 : Micrographies en microscope électronique à balayage: (a) X 1000 (100 μm), (b) X 2000 (50 μm) et (c) X 4000 (20 μm) de l'hydroxyapatite synthétisée.

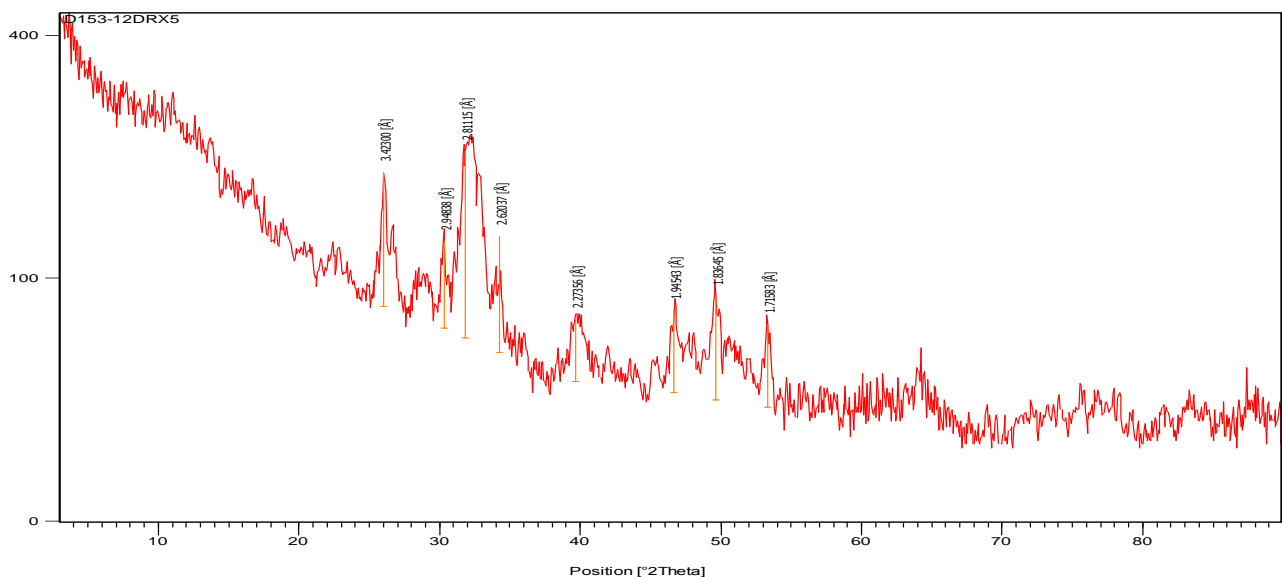


Figure 6 : Diagramme de diffraction des rayons X de l'hydroxyapatite mal cristallisée.

Les spectres d'adsorption infrarouge de l'hydroxyapatite synthétisée avant et après adsorption dans 10mmol/l de L-lysine, DL-leucine et dans leur mélange équimolaire à 18 heures et à 37°C sont reportés sur la *figure 7*. On observe des bandes attribuables à des molécules d'eau (vers 3140 cm^{-1}), des ions hydroxyle OH^- (633 et 3570 cm^{-1}), ainsi que des bandes dues aux vibrations des groupements phosphates PO_4^{3-} (474, 564, 603, 962, 1046 et 1089 cm^{-1}) caractéristiques d'environnements apatitiques. On observe également une bande de faible intensité à 875 cm^{-1} correspondant à des groupements hydrogénophosphate HPO_4^{2-} ; la présence de ces espèces en faible quantité, substituées aux groupements PO_4^{3-} , atteste que l'apatite préparée est légèrement sous stoechiométrique. Après adsorption (*figure 7 (b, c et d)*), on observe un déplacement de la bande associée aux molécules H_2O de 3140 vers 3500 cm^{-1} ; le déplacement et l'élargissement de cette bande peut s'expliquer par l'intervention du groupement NH_3^+ d'acides aminés. En plus, il apparaît une bande située vers 1630 cm^{-1} associée au groupement carboxyle COO^- des acides aminés fixés à la surface du solide.

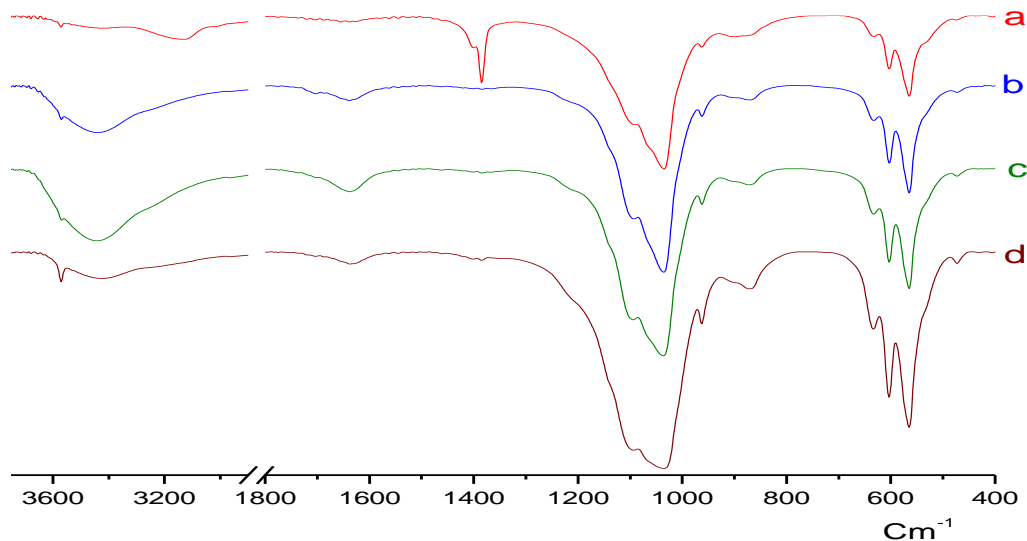


Figure 7 : Spectres d'adsorption infrarouge de l'hydroxyapatite synthétisée de Ca/P= 1.59
a- avant adsorption,
b- après adsorption dans 10mmol/l de la L-lysine,
c- après adsorption dans 10mmol/l de la DL-leucine,
d- après adsorption dans 10mmol/l du mélange équimolaire de L-lysine et DL-leucine.

3.3. Influence du rapport R_a (mg/ml)

Dans des tubes à essais contenant initialement 10 ml d'acide aminé ($C_o = 1\text{mmol/l}$) sont ajoutés des masses m (mg) d'apatite fraîchement préparé et finement broyé. Le rapport masse du solide sur volume de la solution est noté R_a (mg/ml), il est compris entre 1 et 25 mg/ml. Pour chaque valeur de R_a , le mélange est agité et ensuite porté à 37°C dans un bain thermostaté pendant 18 heures.

L'augmentation du rapport R_a (mg/ml) entraîne une diminution de la quantité adsorbée à l'équilibre (*tableau 4*). Des travaux antérieures [24] ont montré que les teneurs de la solution en ions calcium et phosphate augmentent lorsque que R_a croît et que la libération des ions phosphate est beaucoup plus prononcé par rapport à celle des ions calcium. Les valeurs du pH de la solution montrent qu'elle d'autant plus acide que les valeurs de R_a sont élevées (*tableau 4*). Cette observation est à relier à la forte libération des ions hydrogénophosphate dans la solution. Ces ions peuvent entrer en compétition avec les molécules d'acides aminés vis-à-vis des sites calcium de la surface apatitique, ce qui peut réduire le processus d'adsorption en diminuant les attractions adsorbat-adsorbant.

3.4. Influence des ions en solution

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence des ions Ca^{2+} et HPO_4^{2-} en solution. Les résultats de l'étude de l'adsorption de L-lysine et de la DL-leucine à $C_o = 1\text{mmol/l}$ en fonction de la teneur en ions phosphate, calcium et leur mélange (Ca^{2+} et HPO_4^{2-}) sont illustrés dans la *figure 8*.

Tableau 4 : Quantité adsorbée Q_{ads} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) en fonction du rapport Ra (mg/ml) à 37°C.

Ra (mg/ml)	L-lysine		DL-leucine	
	pH	Q_{ads} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	pH	Q_{ads} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)
1	5.86	6.597	5.88	5.443
2	5.67	4.235	5.69	3.126
5	5.48	1.224	5.43	1.072
10	5.42	0.503	5.33	0.341
20	5.44	0.318	5.35	0.288
25	5.41	0.211	5.34	0.193

Quel que soit l'acide aminé étudié, l'ajout d'ions phosphate entraîne une diminution de la quantité adsorbée à l'équilibre Q_{ads} ($\mu\text{mol}/\text{g}$), cette diminution est d'autant plus importante que la teneur en ions HPO_4^{2-} est plus élevée. Contrairement aux ions phosphate, la présence des ions calcium conduit à une légère augmentation de la quantité adsorbée. L'introduction d'un mélange équimolaire d'ions calcium et phosphate semble affecter très peu le processus d'adsorption. Nous constatons également que le pH de la solution après adsorption varie en fonction de la teneur initiale des ions calcium et/ou phosphate ; il est légèrement acide par addition des ions Ca^{2+} (il passe de 5.6 à 4.4) et tend vers des solutions neutres par ajout des ions phosphates (il passe de 5.6 à 7).

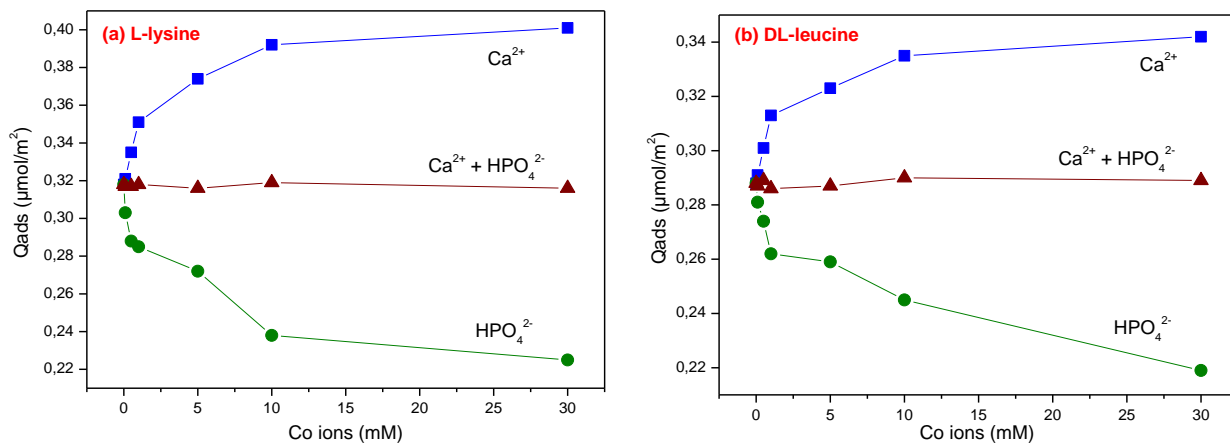


Figure 8 : Quantité adsorbée ($\mu\text{mol}/\text{g}$) en L-lysine (a) et DL-leucine (b) en fonction de la teneur initiale en ions Ca^{2+} , HPO_4^{2-} et ($\text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-}$).

3.5. Effet de la température et paramètres thermodynamiques

La plupart des études d'adsorption par des supports phosphocalciques ont été effectuées à température ambiante (entre 20 et 25°C) ou à température physiologique. Cependant peu d'études ont été consacrées à l'effet de la température sur les phénomènes intervenant à l'interface entre adsorbant et adsorbé. Dans le présent travail, l'influence de la température sur la fixation de la L-lysine et la DL-leucine par l'hydroxyapatite a été étudiée dans un intervalle compris entre 25°C et 40°C. Les résultats sont obtenus pour une durée d'incubation égale à 18 heures et pour une concentration initiale $C_o = 1\text{mmol/l}$ d'acide aminé (tableau 5).

Tableau 5 : Valeurs de Q_{ads} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) en fonction de la température (°C).

Température (°C)	L-lysine	DL-leucine
25	0.3258	0.2973
30	0.3223	0.2939
35	0.3202	0.2904
37	0.3180	0.2880
40	0.3163	0.2868

Le tableau 5 montre le résultat de la variation de la quantité adsorbée de la L-lysine et de la DL-leucine en fonction de la température. L'augmentation de la température de 25 à 40°C, provoque une légère diminution de

la quantité adsorbée à l'équilibre Q_{ads} d'acide aminé. Ce résultat est en accord avec les résultats de travaux antérieurs [17].

Afin de connaître la nature du processus d'adsorption, on détermine les paramètres thermodynamiques y compris la variation d'enthalpie libre ΔG° (J mole⁻¹), les changements d'enthalpie ΔH° (J mole⁻¹) et d'entropie ΔS° (J mole⁻¹ K). Ces paramètres peuvent être calculés en utilisant les équations suivantes :

$$K_c = \frac{(C_o - C_e)}{C_e} \quad (5) \quad \ln K_c = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT} \quad (6) \quad \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (7)$$

Où K_c est la constante d'équilibre thermodynamique, C_o et C_e (mol/l) sont respectivement la concentration initiale et à l'équilibre de l'adsorbat, T est la température en Kelvin (K), R est la constante des gaz parfaits (8.314 J mole⁻¹ K).

Les valeurs de ΔH° et ΔS° peuvent être obtenues à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine des représentations linéaires de $\ln K_c$ en fonction de $1/T$ (figure 9(a)). On peut alors déduire ΔG° à partir de l'équation (7). Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 6. Les valeurs négatives de ΔG° confirment la spontanéité du processus d'adsorption. La valeur de ΔG° devient moins négative par augmentation de la température (figure 9(b)), ce qui peut limiter les interactions hydrophobes adsorbant-adsorbat. L'augmentation de la température provoque une diminution de la quantité adsorbée d'acide aminé à l'équilibre. Les valeurs négatives de ΔH° montrent que le processus d'adsorption est de nature exothermique. De plus les faibles valeurs de ΔH° suggèrent que l'adsorption de la L-lysine et de la DL-leucine sur l'hydroxyapatite déficiente (CDHA) peut être considérée comme un processus purement électrostatique. Les valeurs négatives d'entropie ΔS° indiquent la diminution du désordre des molécules d'acides aminés vis-à-vis la surface de l'apatite (tableau 6).

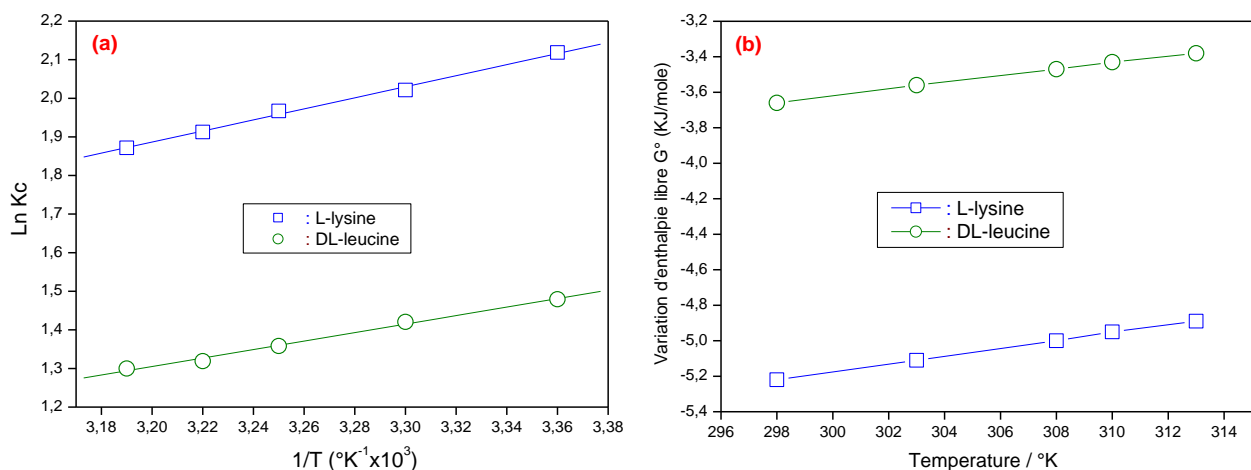


Figure 9 : (a) : Variation de $\ln K_c$ en fonction $1/T$ ($^{\circ}K^{-1}$) et (b) : Variation de Gibbs ΔG° (KJ mole⁻¹) en fonction de T ($^{\circ}K$).

Tableau 6 : Paramètres thermodynamiques de la L-lysine et de la DL-leucine.

Acide aminé	T ($^{\circ}K$)	K_c	ΔG° (KJ mol ⁻¹)	ΔH° (KJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K)	R^2 (%)
L-lysine	298	8.32	-5.22	-11.91	-22.44	99.78
	303	7.55	-5.11			
	308	7.15	-5.00			
	310	6.77	-4.95			
	313	6.50	-4.89			
DL-leucine	298	4.39	-3.66	-9.13	-18.37	99.69
	303	4.14	-3.56			
	308	3.89	-3.47			
	310	3.74	-3.43			
	313	3.67	-3.38			

Les résultats de l'analyse chimique et les techniques de caractérisation (MEB, DRX et FTIR) indiquent que l'adsorbent préparé présente un rapport atomique Ca/P de l'ordre de 1.59 inférieur à celui de l'hydroxyapatite stœchiométrique (1,67) : Il s'agit de l'hydroxyapatite mal cristallisée non stœchiométrique partiellement substitués avec HPO_4^{2-} , qui lui donne une charge de surface cationique.

L'adsorption des acides aminés L-lysine, DL-leucine et de leur mélange équimolaire par l'hydroxyapatite mal cristallisée dans les conditions examinées se fait selon une cinétique relativement rapide. Dans tous les cas le plateau d'équilibre est atteint dès les premières heures d'incubation. Ceci témoigne de la grande réactivité de la surface apatitiques vis-à-vis de molécules d'intérêt biologique. Des observations similaires sont notées pour l'adsorption des acides aminés présentant divers groupement fonctionnels par la surface de matériaux apatitiques de basse cristallinité : L-lysine et DL-leucine [17] et [25], DL-alanine et L-phénylalanine [20], la glycine [23], phosphoserine et serine [26]. L'isotherme d'adsorption suit aussi bien la loi de Langmuir que celle de Freundlich, le solide étant saturé pour des faibles concentrations en adsorbat (adsorption en monocouche), traduisant de ce fait la grande réactivité de la surface du matériau vis-à-vis de ces adsorbats. Des allures similaires de type Langmuir ont été rapportées dans la littérature [17, 20,26] ainsi que celles qui s'attribuent à la loi de Freundlich [23].

L'étude des propriétés d'adsorption des adsorbats vis-à-vis l'hydroxyapatite déficiente (CDHA) montre que le coefficient d'affinité que ce soit de Langmuir b (l/mole) ou de Freundlich a (l/g) est fonction de la nature du couple adsorbat-adsorbant. Il est à peu près deux fois plus important pour la L-lysine que pour la DL-leucine. La valeur du coefficient d'affinité du mélange des deux acides aminés se trouve entre celles des deux acides aminés. Ce qui indique que la quantité la plus adsorbée à l'équilibre est celui de la L-lysine ; acide aminé le plus polaire. Par ailleurs, la diminution de ce coefficient pour le mélange des deux acides aminés de caractère différents se traduit par une compétition entre L-lysine et DL-leucine vis-à-vis la surface apatitique. Notons également que la valeur observée de Q_∞ ($\mu\text{mol/g}$), qui correspond à un recouvrement total de la surface du solide par les molécules d'adsorbat, est plus importante pour la L-lysine que pour la DL-leucine. Cela signifie que la charge latérale de l'acide aminé joue un rôle significatif dans leur fixation à la surface de l'apatite.

L'étude du solide par spectroscopie d'absorption infrarouge met en évidence la fixation des adsorbats utilisés. Ainsi elle fait apparaître des bandes caractéristiques de l'acide aminé. En effet, la présence de bandes caractéristiques des groupements carboxyle $-\text{COO}-$, et l'absence de bandes attribuables aux groupements $-\text{COOH}$, indiquent que l'adsorption est principalement due à l'interaction électrostatique entre les groupements $-\text{COO}-$ des acides aminés et les ions calcium Ca^{2+} de l'apatite, ce qui concorde bien avec nos précédent résultat [17] et [27].

L'augmentation du rapport R (masse du solide (mg) sur volume de la solution (ml)) entraîne une réduction de la quantité adsorbée à l'équilibre. Cette réduction peut s'expliquer par la forte libération des ions phosphate qui entre en compétition avec les molécules d'acides aminés pour les sites de fixation de la surface de l'hydroxyapatite déficiente.

L'ajout d'ions minéraux constituant le réseau apatitique dans le milieu d'incubation modifie considérablement les propriétés de l'interface entre ces matériaux et leur environnement. Ainsi, l'introduction d'ions phosphate entraîne une diminution de l'adsorption, cette diminution s'interprète par le fait que ces ions présentent une grande affinité pour la surface du minéral apatitique et par conséquent inhibent la fixation de molécules anioniques, suite à leur compétition avec les groupements COO^- des acides aminés pour les sites actifs des ions Ca^{2+} situés à la surface de l'apatite. Contrairement aux ions phosphate, l'ajout d'ions calcium conduit à une légère augmentation de la quantité d'acide aminé adsorbée. Les ions calcium en solution vont se fixer sur les sites phosphate de l'apatite et peuvent conduire à un changement de polarité de la surface de l'apatite en facilitant les interactions électrostatiques avec les groupements chargés négativement [28]. Des travaux antérieurs montrent que les ions calcium sont capables de se fixer directement sur les protéines et des ponts calcium peuvent donc se former entre la protéine et l'hydroxyapatite [29]. Pour des teneurs relativement importantes, les ions Ca^{2+} peuvent donner lieu en présence d'adsorbats anioniques, des complexes solubles et/ou insolubles [30-31]. Par ailleurs, l'ajout d'un mélange équimolaire des ions calcium et phosphate semble affecter très peu le processus d'adsorption. Ces résultats expérimentaux relatifs à l'influence de ces ions sur l'adsorption, traduisent l'existence d'une réaction d'échange ionique impliquant les molécules d'adsorbats de la solution et les ions de la couche hydratée à la surface apatitique.

L'étude thermodynamique montre que le processus d'adsorption d'acides aminés utilisés sur l'hydroxyapatite déficiente (CDHA) est spontané, exothermique et de nature physique, mettant en jeu des interactions électrostatiques à courtes distances (interactions de Van der Waals).

Conclusion

L'étude du phénomène d'adsorption des molécules biologiquement actives par des phosphates de calcium, mal cristallisées a montré que ces phosphates synthétiques de structure apatitique peuvent jouer le rôle de support des médicaments en milieu dit physiologique.

Ce travail constitue une base de données pour la compréhension du phénomène d'adsorption des molécules bioactives à usage thérapeutique sur des phosphates de calcium apatitiques. Ce phénomène ne peut pas être simplifié à une réaction avec les groupements de l'apatite. Il dépend de la composition du milieu environnant qui peut être considéré comme une variable expérimentale et des caractéristiques physico-chimiques de la surface apatitique qu'est éventuellement le siège des autres phénomènes: échange ionique, dissolution, évolution, sursaturation, précipitation...etc. La compréhension de l'ensemble de ces phénomènes *in vitro* offre la possibilité de développer des systèmes à base de biomatériaux phosphocalciques destinés aux mécanismes biologiques.

Références

1. Zhou H., Lee J., *Acta Biomaterialia*. 7 (7) (2011) 2769-2781.
2. Deville. S, Saiz. E, Tomsia A. P., *engineering Biomaterials* 27 (32) (2006) 5480-5489.
3. Zhao Q., Wang T., Wang J., Zheng L., Jiang T., Cheng G., Wang S., *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 10126.
4. Son J. S., Appleford M., Ong J. L., Wenke J. C., Kim J. M., Choi S. H., Oh D. S., *Journal of Controlled Release* 153 (30) (2011) 133-140.
5. Talal A., Waheed N., Al-Masri M., McKay I.J., Tanner K.E., Hughes F.J., *J. Dentistry* 37 (2009) 820.
6. Öner M., Yetiz E., Ay E., Uysal U., *Ceramics International* 37 (7) (2011) 2117-2125.
7. Eichert D., Salomé M., Banu M., Susini J., Rey C., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 60 (6) (2005) 850-858.
8. Rey C., Combes C., Drouet C., Grossin D., *Comprehensive Biomaterials* 1 (2011) 187-221.
9. Elliott J. C., Structure and chemistry of apatites and other calcium orthophosphates. *Elsevier, Amsterdam* (1994) 149.
10. Posner A.S., Stutman J.M., Lippincott E.R., Hydrogen-bonding in calcium-deficient hydroxyapatite. *Nature* 188 (1960) 486 – 487.
11. Dorozhkin S.V., *Materials* (2) (2009) 399-498.
12. Rey C., Lian J.L., Grympas M., Shapiro F., Zulkerg L., Glimcher M.J., *Tissue Res* (1989) 21- 267.
13. Rose W.C., Haines W.J., Warner D.T., *J Biol Chem* 193 (1951) 605 -12.
14. Darmaun D., *Nutrition et métabolisme* 22 (2008) 142-150.
15. Dawson R.M.C., et al., Data for Biochemical Research, Oxford, *Clarendon Press*. (1959).
16. Nagai H., Carta G., *Sep. Sci. Tech.* 39 (16) (2004) 3691–3710.
17. El Rhilassi A., El Boujaady H., Bennani-Ziatni M., El Hamri R., Taitai A., Adsorption de la L-lysine et de la DL-leucine sur des phosphates de calcium précipités analogues a la partie minérale du tissu osseux – *Ann. Chim. Sci. Mat.* 36 (1) (2011) 45-57.
18. Jouillé M.M., Thompson T.R., Nemeroff N.H. - Ninhydrin and Ninhydrin Analogs. Syntheses and Applications – *Tetrahedron* 47 (1991) 8791-8830.
19. Misra D.N., Interaction of ortho-Phospho-l-serine with Hydroxyapatite: Formation of a Surface Complex, *J Colloid Interface Sci.* 194 (1) (1997) 249-255.
20. Bihi N., Bennani-Ziatni M., Taitai A., Lebugle A., Adsorption d'acides aminés sur des phosphates de calcium carbonates analogues aux tissus calcifiés – *Ann. Chim. Sci. Mat.* 27(2) (2002) 61-70.
21. Langmuir I., The constitution and fundamental properties of solids and liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 40 (1918) 1361.
22. Freundlich H., Colloid and Capillary Chemistry, translated from the 3rd German Edn. by H.S. Hatfield, *Methuen, London* (1926) 61- 66.
23. Bennani-Ziatni M., Lebugle A., Taitai A., Ferhat M., Adsorption de la glycine en milieu eau- éthanol sur un phosphate de calcium précipité, *Ann. Chim. Fr.* 22 (1997) 537-547.

24. A. Ouadiay, Réactivité d'une bioapatite phosphocalcique en milieu dit physiologique : propriété d'évolution et d'adsorption, *thèse, Kenitra, Maroc* (2005).
25. El Rhilassi A., Mourabet M., El Boujaady H., Bennani-Ziatni M., El Hamri R., Taitai A., Adsorption and release of amino acids mixture onto apatitic calcium phosphates analogous to bone mineral. *Applied Surface Science* 259 (2012) 376–384
26. Benaziz L., Barroug A., Legrouri A., Rey C., Lebugle A., Adsorption of phosphoserine and serine onto poorly crystalline apatites, *J. Colloid Interface Sci.* 238 (2001) 48-53.
27. El Rhilassi A., Mourabet M., El Boujaady H., Ramdane H., Bennani-Ziatni M., El Hamri R., Taitai A., Release of DL- leucine by biomaterials: Apatitic calcium phosphates analogous to bone mineral. *J. Mater. Environ. Sci.* 3 (3) (2012) 515-524
28. Yin G., Liu Z., Zhan J., Ding F., Yuan N., *Chemical Engineering Journal* 87 (2002) 181.
29. Hughes Wassel D.T., Hall R.C. and Embery G., *Biomaterials* 16 (1995) 697.
30. Shimabayashi S., Tanizawa Y., Ishida K., *Chem. Pharm. Bull.*, 39(9) (1991) 2183.
31. Rawls H.R., Bartels T., Arends J., *J. Colloid Interface Sci.* 87 (2) (1982) 339.

(2014) ; <http://www.jmaterenvirosci.com>