

SPECTROMETRIE RAMAN APPLIQUEE AUX TISSUS CALCIFIES ET AUX BIOMATERIAUX PHOSPHO-CALCIQUES

PENEL¹ G., LEROY¹ G., LEROY¹ N., BEHIN² P., LANGLOIS² J. M., LIBERSA² J. C., DUPAS² P. H.

1 LBM Raman - Faculté d'odontologie, Lille - France

2 Faculté d'odontologie, Lille - France

MOTS CLES: raman, hydroxyapatite, tricalcium phosphate β , tissus calcifiés.

KEY-WORDS: raman, hydroxyapatite, β tricalcium phosphate, calcified tissues

RESUME

La partie rigide du corps humain est essentiellement composée d'apatite carbonatée (phosphate de calcium). La biologie n'a pas d'outils pour étudier cette phase dite "minérale" pourtant bâtie sur une trame organique. La microcaractérisation Raman donne une nouvelle approche des composés tels que la dent et l'os par une analyse très fine des liaisons chimiques à une échelle micrométrique. Cette technique permet en particulier de caractériser, d'évaluer et de doser des ions comme les carbonates, les phosphates acides, les protéines et les acides gras. Il est également possible d'identifier d'autres composés organiques ou minéraux (carbonate de calcium, oxyde de calcium, certaines substitutions d'ions par exemple). La microspectrométrie Raman peut également être utilisée pour étudier les qualités physico-chimiques de biomatériaux et leurs évolutions après implantation en site dentaire ou osseux. Il est possible sur des phosphates de calcium synthétiques de distinguer le β -TCP de la brushite et de l'hydroxyapatite et de doser des impuretés rencontrées dans les dépôts de torche à plasma. Il est également possible de doser les α , β , γ pyrophosphates rencontrées parfois sur les β -TCP du commerce. C'est la seule technique non destructrice permettant l'identification à l'échelle du micron des liaisons chimiques et donnant "l'empreinte digitale" du composé étudié.

ABSTRACT

The rigid part of the human body consists essentially of carbonated apatite (calcium phosphate). Biologists don't have any tools to study this "mineral" phase, though its origin is organic. A new approach of some compounds like enamel or bone is obtained with the Raman micro-characterisation by a very fine analysis of chemical bonds in a micrometric scale. This method allows the characterisation, the analysis and the dosage of ions, like carbonate, acid phosphates, proteins and fatty acids. The identification of other organic or mineral compounds (e.g. calcium carbonate, calcium oxide, substituant ions...) is also possible. The Raman microspectrometry can also be used to study the chemical and physical properties of biomaterials and their evolution after implantation in a dental or bone site. On synthetical calcium phosphate, β -TCP, brushite and hydroxyapatite can be distinguished and the impurities found in plasma spray deposits can be measured. The detection of α -, β -, or γ - pyrophosphates could be obtained in some commercial β -TCP. The Raman microspectrometry is the only non-destructive method which allows the identification of the chemical bonds in a micrometric scale and gives the "fingerprint" of the studied component.

INTRODUCTION

L'habitude veut que l'os soit caractérisé par une phase minérale et par une phase organique. Cette partie cellulaire est identifiable par ses protéines constitutives. Elle a plusieurs rôles ;

- régénération de la partie minérale après traumatisme (fracture par exemple) ou simplement continuellement au cours de la vie,
- croissance dans les premières années de la vie.

La partie minérale essentiellement composée de phosphate de calcium carbonaté (apatite carbonatée) se présente sous la forme de cristaux donnant à l'os ou à la dent sa structure rigide et permettant d'obtenir des caractéristiques mécaniques en relation avec la fonction.

La partie minérale prend toute son importance de par sa structure interne pour assurer la rigidité d'un être vivant. Pourtant, pour des raisons de commodité et de simplicité, c'est la phase protéique qui est la plus connue et qui sert de révélateur de la zone osseuse. Actuellement il existe des possibilités d'étudier directement la phase minérale et d'en déterminer ses propriétés mécaniques, micromécaniques, cristallographiques et physico-chimiques (Elliott 1994).

Il est également important d'étudier la phase minérale à différentes échelles allant des propriétés mécaniques de l'os entier jusqu'aux propriétés cristallographiques. La corrélation entre les propriétés mécaniques et physico-chimiques des cristaux et leur répartition pour former l'os apparaît primordiale pour modéliser les biomatériaux.

Les méthodes de caractérisation des zones minérales osseuses font appel à l'analyse ultrasonore, aux différents types de microscopie électronique (diffraction, sondes de Castaing, etc...), à la RMN du solide, à la diffraction X, à la microscopie confocale, et les microanalyses en spectrométrie Infrarouge et RAMAN (Bres E 1986, Bres E. et al. 1993, Gadaleta S.L. et al. 1996).

L'information, fournie par le Raman, est différente des techniques habituellement utilisées (microscopie électronique, diffraction X, etc...) qui identifient des atomes ou des groupes d'atomes sans avoir accès à la molécule. La spectrométrie Raman précise l'état de la molécule ou du cristal et permet une identification avec un risque d'erreur très faible. Elle apporte des informations sur les molécules elles-mêmes et non sur les atomes constituants de ces molécules. Par exemple, il n'est pas possible en Raman de pouvoir estimer le rapport Ca/P. Par contre, nous pouvons retrouver des molécules qui ne devraient pas être présentes, et les identifier avec une quasi certitude.

Il est possible d'étudier des échantillons en diffusion Raman à l'échelle du micron (quelques pico-grammes) ou de quelques microns pour mieux appréhender les phénomènes de surface. Certains appareils permettent également de réaliser des cartographies suivant les spectres en travaillant en microspectrométrie Raman confocale. Ces nouvelles techniques alliées à des appareillages de moins en moins chers (suivant les possibilités offertes) et à une utilisation de plus en plus facile lui laissent présager d'un avenir très important.

MATERIELS ET METHODES

Le microspectromètre Raman

Nous disposons d'un spectromètre Raman OMARS 89 (DILOR). Un microscope métallographique équipé d'objectifs à l'infini qui focalise le faisceau laser sur l'échantillon et recueille la lumière rétro-diffusée. Pour améliorer le rapport signal/bruit, nous utilisons un montage optique du type confocale.

Le détecteur est constitué d'un tube intensificateur de lumière et d'une barrette de photodiodes qui permettent l'analyse d'une portion de spectre. Après traitement informatique il est affiché sur un écran de micro-ordinateur et peut être accumulé ou subir des traitements mathématiques divers de lissage ou de correction.

En résumé, cette méthode est capable d'analyser ou plutôt d'identifier des molécules à forte concentration dans un volume de quelques μm^3 soit quelques picogrammes.

Préparation des échantillons biologiques

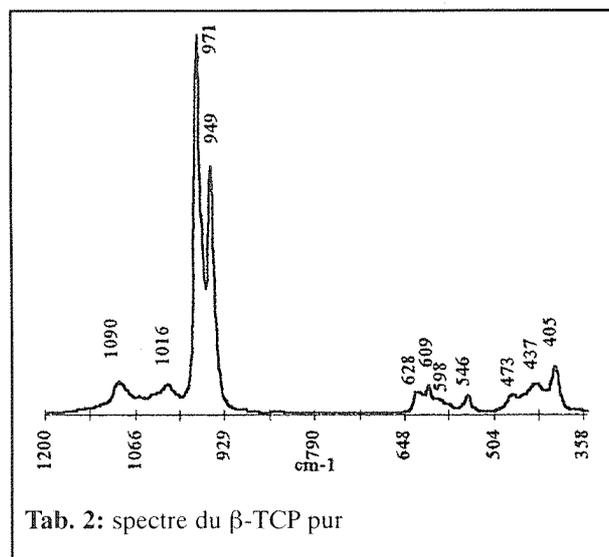
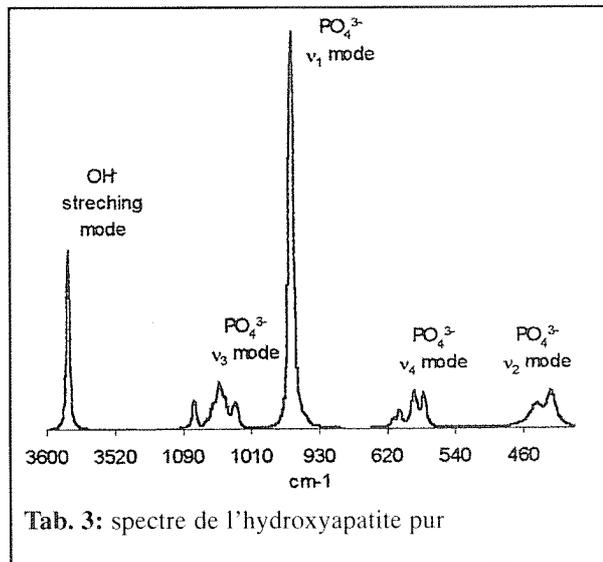
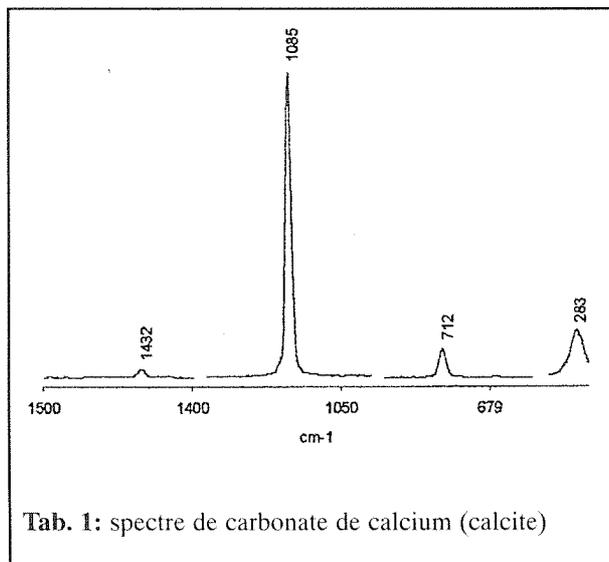
Pour certains échantillons osseux une préparation spécifique peut être nécessaire (Termine et al. 1973, Penel et al. 1998), mais en général les échantillons biologiques ne demandent aucune préparation. Pour leur conservation il est possible de faire appel au traitement par fluide hypercritique. Les échantillons synthétiques sont analysés directement.

RESULTATS

Les produits de synthèse.

Les biomatériaux de substitution les plus utilisés en contact avec l'os proviennent de deux familles chimiques:

Les carbonates de calcium, dont l'aragonite et la calcite, ont des spectres Raman différents (Nakamoto 1970). Les carbonates de calcium utilisés sont issus de



coraux. Le spectre de la calcite (Tab. 1) par exemple se caractérise principalement par un pic très intense à 1086 cm^{-1} (ν_1) et d'autres pics moins intenses à 1432 , 712 , 283 cm^{-1} .

Les phosphates de calcium.

Le β -TCP

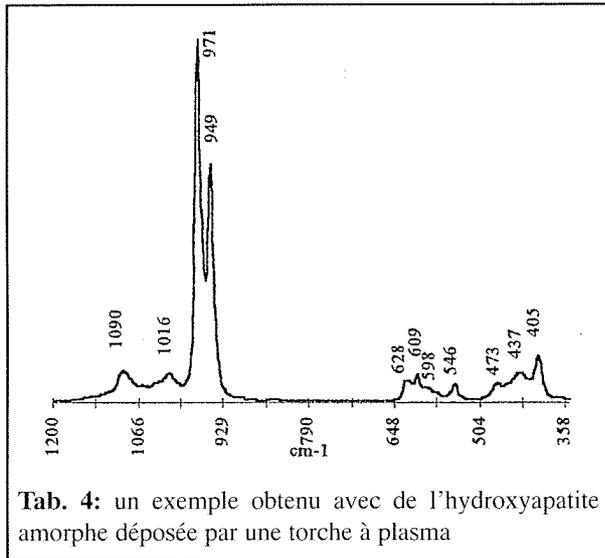
La caractérisation par Raman se fait principalement par les ions phosphates dans leur environnement. A titre d'exemple nous reproduisons ici les spectres de deux types de phosphates de calcium; le β -tri-calcium-phosphate ou β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) et le l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Penel et al. 1997).

Le spectre Raman du β -TCP est très caractéristique avec ses deux pics sur le ν_1 à 945 cm^{-1} et 968 cm^{-1} . Les autres modes de vibrations sont également très différents de ceux de l'hydroxyapatite (voir tableau 2 et 3). Ce produit est assez bien résorbable mais à des caractéristiques mécaniques moins bonnes que d'autres apatites.

L'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est un phosphate de calcium cristallisé sous une forme hexagonale ($P63/m$). Il est considéré comme étant peu résorbable en milieu biologique, mais ses propriétés mécaniques sont bien meilleures que la plupart des autres phosphates de calcium.

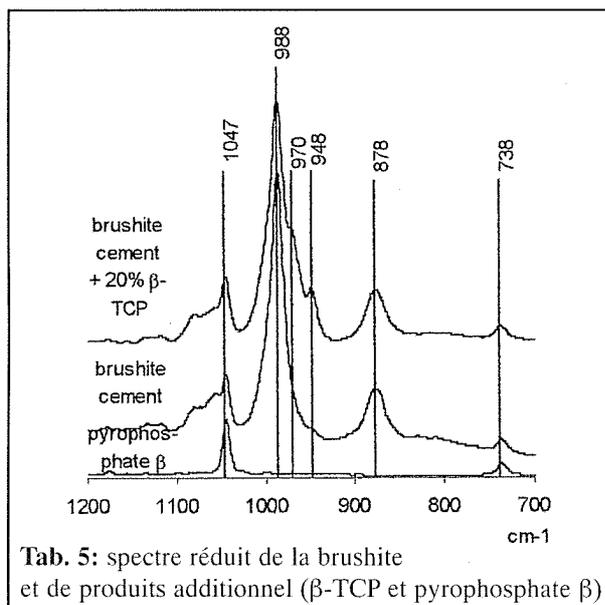
Le spectre Raman de l'hydroxyapatite (tableau 3) présente peu d'intérêt en dessous de 900 cm^{-1} car cette zone est commune à un grand nombre de phosphates de calcium. Par contre, il est très intéressant d'étudier les évolutions sur ce que l'on appelle le ν_1 et le ν_3 car cette zone est la plus sensible à de faible modification de structure (Penel et al 1997). D'abord le ν_1 est unique à 962 cm^{-1} , très intense et très étroit (plus la largeur à mi hauteur est grande, moins la cristallisation est bonne). Le ν_3 peut se décomposer en 7 pics dont certains sont des épaulements (1029 , 1034 , 1041 , 1049 , 1057 , 1064 et 1077 cm^{-1}). Les intensités sont beaucoup plus faibles que pour le ν_1 . Pour le mode ν_1 de vibration des groupements hydroxyl OH, il n'existe qu'une bande unique à 3572 cm^{-1} .



Tab. 4: un exemple obtenu avec de l'hydroxyapatite amorphe déposée par une torche à plasma

Les apatites amorphes (dépôts de OHAp à la torche à plasma)

Le fait remarquable que l'on peut observer sur ce spectre de l'hydroxyapatite déposé par torche à plasma pour par exemple le recouvrement d'implants, (Tab. 4) est un élargissement des pics avec en particulier au niveau du ν_3 une vague bosse ne permettant plus de définir les raies caractéristiques. Ce résultat semble dû au fait que toutes les fréquences de vibration ne sont pas identiques à cause d'une hétérogénéité de la matière (mauvaise cristallisation). Les fréquences semblent diminuer en particulier sur le ν_1 passant de 962 cm^{-1} à 950 cm^{-1} .



Tab. 5: spectre réduit de la brushite et de produits additionnel (β -TCP et pyrophosphate β)

Les ciments brushite

Les biomatériaux osseux injectables sont réalisés par mélange extemporané aqueux de β -TCP et de Phosphate Mono-calcique Mono-hydraté (MCPM). Dans certains échantillons nous pouvons retrouver des molécules qui ne devraient pas être présentes et les identifier avec certitude. C'est ainsi que lors de l'analyse d'un ciment, nous avons retrouvé des bandes très fines vers 740 et vers 1050 cm^{-1} , bandes que nous avons facilement reconnues pour être celles du pyrophosphate β . Puis ces bandes ont été retrouvées dans le β -TCP qui a servi à réaliser ce ciment. Il semble donc très facile de suivre un polluant pour en connaître l'origine. Il est même possible de donner une estimation de la concentration de ce pyrophosphate (par exemple 4% dans la tableau 5).

- le β -TCP a ses pics principaux à 970 et 948 cm^{-1} , attribuables à l'ion PO_4^{3-} qui, se trouvant dans plusieurs environnements différents à l'échelle élémentaire du cristal, donne des fréquences (donc des raies) différentes, mais proches sur le mode de vibration ν_1 ,
- pour la brushite, la bande à 988 cm^{-1} est attribuable à l'ion phosphate, et la bande à 878 cm^{-1} est attribuable à l'ion HPO_4^{2-} ,

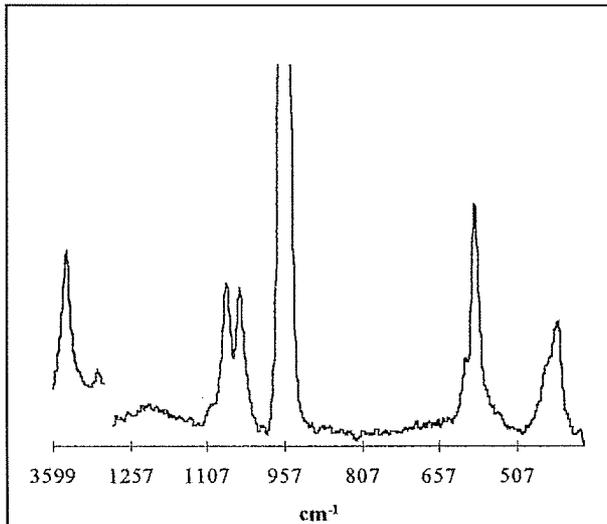
Ces spectres permettent d'évaluer la concentration en β -TCP à l'échelle du μm dans le ciment. Les épaulements aux fréquences de 968 cm^{-1} , 948 cm^{-1} par rapport à la courbe de départ sont proportionnels à la concentration en β -TCP

Les tissus calcifiés

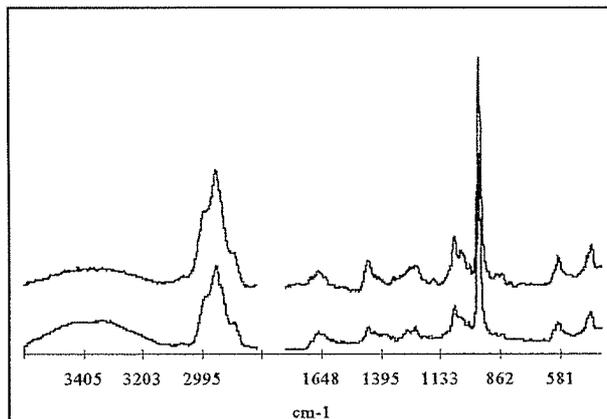
L'émail dentaire

Sous une forme légèrement carbonatée, l'hydroxyapatite constitue la partie essentielle de l'émail dentaire (à plus de 98%). L'émail (Tab. 6) est constitué de cristaux bien orientés à l'intérieur de prismes qui lui donnent cette caractéristique de dureté.

L'émail dentaire présente un spectre Raman d'un grand intérêt, car nous avons, là, une phase minérale pouvant presque être considérée comme pure en Raman. Nous avons donc bien là un exemple d'une forme apatitique naturelle, bien cristallisée, avec une bonne orientation des cristaux repérables sous microscope optique. En comparaison avec l'hydroxyapatite, le spectre de l'émail ne présente pas beaucoup de modification sur les modes de vibration ν_2 et ν_4 . Sur le ν_1 , il est observé une légère diminution de la fréquence (960 cm^{-1}). Le ν_3 est largement modifié (Tab. 8) avec l'apparition de deux pics principaux à 1044 cm^{-1} et à 1072 cm^{-1} . D'autres pics secondaires existent mais il est pratiquement impossible de les identifier sur un simple spectre.



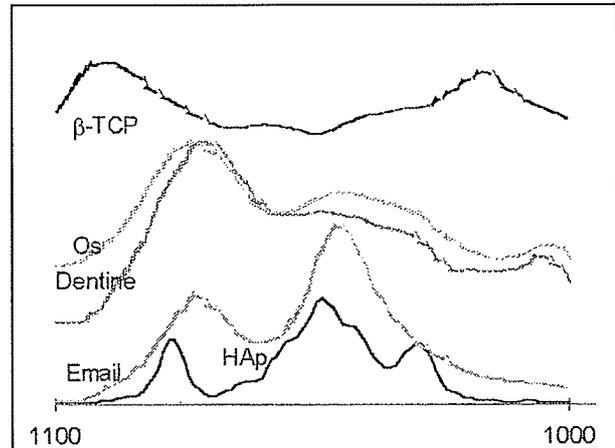
Tab. 6: spectre Raman de l'émail



Tab. 7: spectre Raman de la dentine (en bas) et de l'os (en haut)

Les deux pics principaux sur le ν_3 apparaissent à partir d'une faible carbonatation de l'hydroxyapatite et restent stables en fréquences pour des concentrations en carbonates très importantes (os). Le pic à 1044 cm^{-1} est attribué uniquement à l'ion phosphate et le pic à 1072 cm^{-1} est la somme d'un pic du phosphate et du ν_1 du carbonate. La comparaison de ces deux pics permet le dosage (Penel et al. 1998).

Mais le plus surprenant est l'apparition dans le domaine des groupements hydroxyl OH⁻ de deux bandes dont une à 3573 cm^{-1} comme sur l'hydroxyapatite et



Tab. 8: spectre comparés des ν_3 de l'hydroxyapatite, de l'émail, de la dentine, de l'os et enfin du β -TCP

l'autre à 3512 cm^{-1} qui pourrait provenir d'une localisation légèrement différente de certains OH ou d'une substitution d'un calcium par un autre métal divalent.

La dentine et l'os

La dentine a un spectre Raman (Tab. 7) comportant une phase minérale et une phase organique. La phase minérale correspond au spectre de l'émail déjà vu avec une intensité beaucoup plus grande du pic à 1071 cm^{-1} correspondant à une augmentation de la carbonatation de type B. La phase organique est, elle, caractérisée par les bandes d'amide I et III à 1680 et 1250 cm^{-1} respectivement et des bandes à 1450 cm^{-1} et 2900 cm^{-1} correspondant à deux modes de la vibration de la liaison C-H du collagène. L'os donne un spectre très voisin de la dentine (Tab. 8).

La comparaison des différents ν_3 des phosphates de calcium naturel ou non, montre bien les modifications observées entre l'hydroxyapatite et les tissus calcifiés avec un déplacement des fréquences sur les pics principaux et modifications des intensités (Penel et al 1998). Il faut également observer la similitude des fréquences des pics entre l'émail, la dentine et l'os avec toutefois pour ces deux derniers l'apparition d'un pic vers 1003 cm^{-1} qui est attribué au phosphate acide. Le β -TCP quant à lui ne présente sur le ν_3 aucune similitude avec les autres composés analysés.

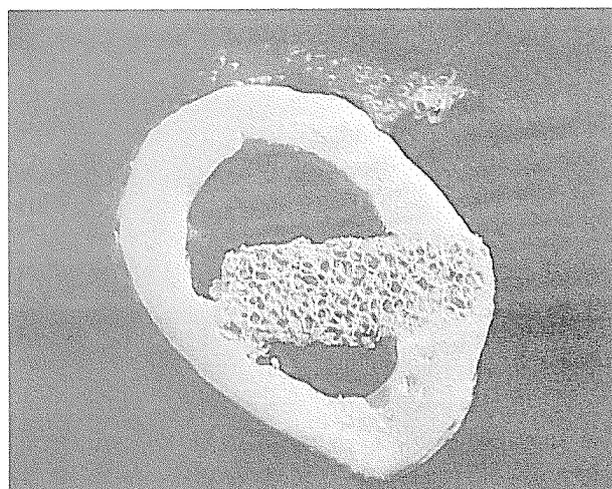


Fig. 1: implant de β -TCP dans un fémur de lapin

Colonisation du β -TCP et de l'OHAp implanté dans un os de lapin. (Penel et al 1997)

Deux sites sont utilisés au niveau des deux fémurs de chaque lapin, le site cortico-médulaire et le site spongieux droit pour OHAp et le site cortico-médulaire et le site spongieux gauche pour β -TCP. Les prélèvements ont été réalisés à 8, 12 et 24 semaines pour révéler l'évolution de la colonisation des deux types de produits.

Nous n'avons pas observé de différence entre la zone corticale et la zone spongieuse. Par contre la colonisation de l'implant de β -TCP (70 % au bout de 24 semaines) est beaucoup plus rapide que la colonisation de l'hydroxyapatite (30 % au bout de 24 semaines). Pourtant les observations visuelles montrent une grande différence entre la zone d'implant plus dense et la zone osseuse, ce qui semble indiquer une colonisation et une transformation de l'implant à l'échelle microscopique tout en gardant l'hétérogénéité macroscopique. Si la colonisation de l'implant est effective, elle ne correspond pas à une transformation de l'implant lui-même en zone osseuse. La colonisation se fait à partir du périoste et des zones d'os en contact pour pénétrer lentement à l'intérieur de l'implant.

En résumé, la microspectrométrie Raman permet d'identifier les zones colonisées contenant du HAp et le β -TCP et les zones de néoformation osseuse à partir de l'étude de la phase minérale, et non à partir de la présence ou non de protéines qui est une mesure indirecte.

Identification des lipides dans l'os maxillaire de mini-porc

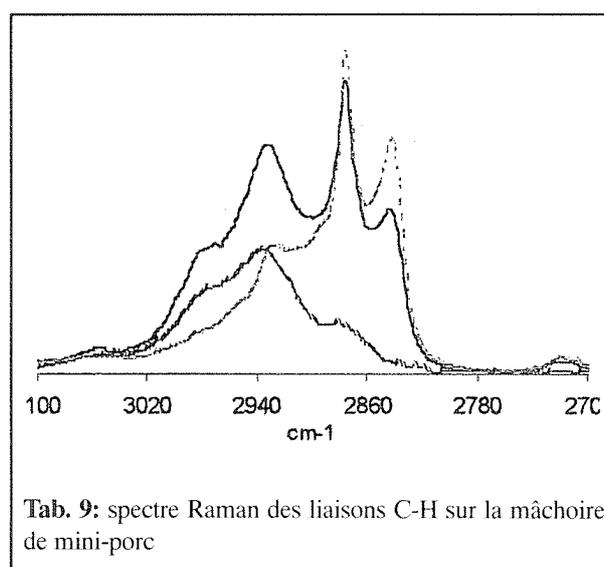
Dans notre cas (voir la tableau 9) sur la mâchoire de mini-porc sans préparation, des bandes attribuables aux lipides sont plus fines et doivent provenir de lipides de faibles poids moléculaires dans la zone des fréquences de vibrations des liaisons C-H. Les valeurs trouvées sont assez différentes des valeurs précédentes.

L'attribution des bandes de la liaison C-H est assez complexe:

- pour les aliphatiques
 - de 2960 à 2870 cm^{-1} ceux sont les C-H du groupe méthyl CH_3
 - de 2925 à 2850 cm^{-1} ceux sont les C-H du groupe éthyl CH_2
 - à 2890 cm^{-1} ceux sont les C-H du groupe C-H
- pour les aromatiques, entre 3080 et 3010 cm^{-1} on rencontre les C-H du groupe benzène avec la raie très intense et très fine de la respiration du cycle à 1000 cm^{-1} .

Etude préliminaire des amalgames dentaires

Sur des dents obturées à l'amalgame ayant séjournés en bouche pendant plusieurs années de nombreuses bandes d'identification difficile apparaissent en surface. En effet les études sont rares et il est délicat de conclure trop rapidement sur une seule série d'essais. Nous observons un spectre de lipide de type osseux (moelle), ou le spectre du carbonate de calcium ou une bande unique à 473 cm^{-1} dont nous n'avons pas pu définir la provenance. L'origine endogène ou exogène de ces molécules reste à déterminer.



Tab. 9: spectre Raman des liaisons C-H sur la mâchoire de mini-porc

Par contre au dessous d'un amalgame nous avons observé une bande à 435 cm^{-1} que nous pouvons attribuer au ZnO utilisé en fond de cavité. Ce type de recherche sur les amalgames dentaires pourrait déboucher sur une meilleure connaissance du vieillissement de ce produit en bouche mais cela va demander une véritable recherche clinique avec une parfaite connaissance du produit de départ, préalable indispensable pour une recherche sérieuse.

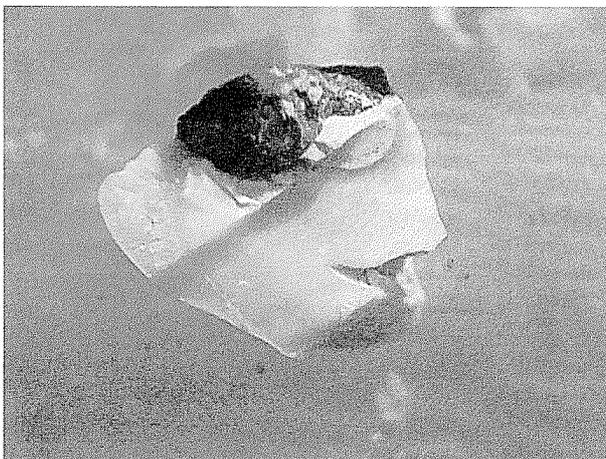


Fig. 2: dent fendue avec son amalgame

Evaluations biologiques des ciments brushite.

L'utilisation de ciment résorbable comme substitut osseux semble être actuellement une solution d'avenir pour les implantologues. Des ciments à base de brushite implantés pendant 6 mois et un an dans des fémurs de moutons ont été étudiés par microspectrométrie Raman (Penel et al 1999).

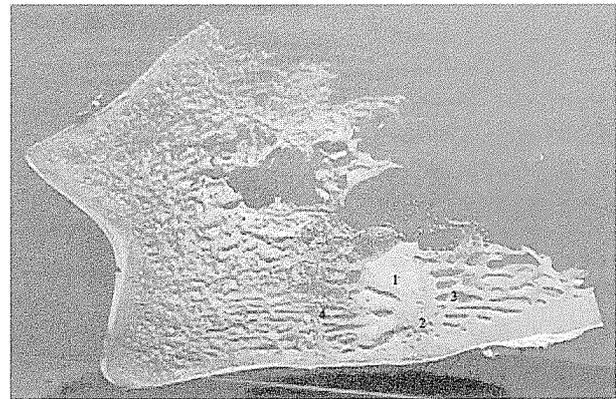


Fig. 3: échantillon 4120 G de mouton sacrifié à 52 semaines préparé pour étude en microspectrométrie

Les résultats à 24 et à 52 semaines sont assez similaires, les seules différences se retrouvant dans les compositions relatives des échantillons.

Sur la coupe à 52 semaines qui est présentée sur la figure 3, on peut remarquer quatre zones autour de l'implant:

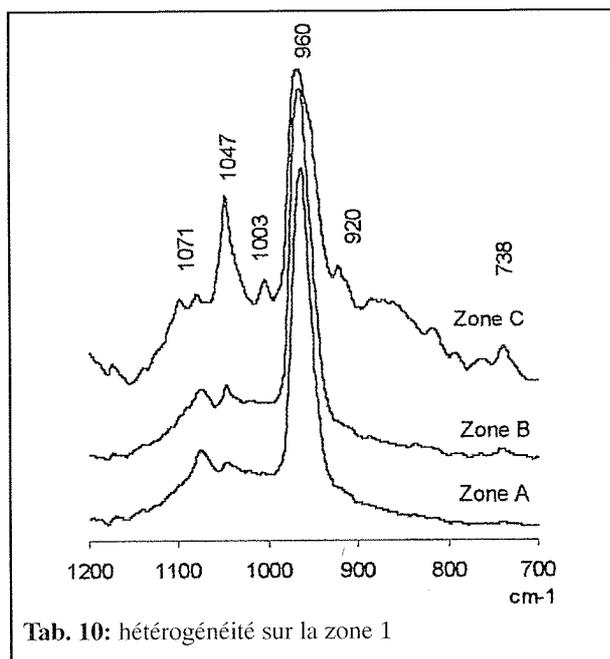
- La zone 1 et 2 montre un spectre assez semblable à l'os, mais avec peu de protéines,

- Les zones 3 et 4 peuvent représenter les limites de l'implant au moment de sa prise. Les trabécules à l'intérieur de cette zone sont moins denses. Il existe donc une bordure osseuse qui entoure l'implant. Les raisons de ce phénomène n'apparaissent pas très clairement. Il faut noter la vallée qui s'est creusée dans l'implant comme si celui-ci n'était pas homogène.

Un agrandissement de la zone 1, qui n'est pas présenté ici, permet de montrer que, sur 3 domaines distincts, les spectres Raman sont différents voir tab. 10:

En [A] on obtient un spectre correspondant à de l'apatite carbonatée type B avec en particulier un pic très intense à 1074 cm^{-1} . Les concentrations en phosphates acides restent très faibles.

En [B] l'observation au microscope montre un nuage blanc comme de la poudre. Le spectre obtenu est plus complexe. Le n1 peut se décomposer en 4 pics (identifiés par le calcul de la dérivée seconde): 972 , 963 , 949 , et 937 cm^{-1} . Le pic à 963 cm^{-1} doit correspondre au pic observé sur l'apatite carbonatée type B. Les pics à 972 et 949 cm^{-1} peuvent correspondre au β -TCP. Le pic à 937 cm^{-1} n'est pas attribuable pour le moment.



Tab. 10: hétérogénéité sur la zone 1

En [C] l'observation visuelle montre la présence de petits cristaux jaunes. Le spectre est encore plus complexe et semble indiquer la présence de plusieurs composés contenant du phosphate (avec à priori une plus forte concentration en phosphate acide). Il y a présence de pyrophosphates, sans aucun doute possible.

Nous montrons ici une certaine hétérogénéité dans la cinétique de résorption

DISCUSSION

Les applications de la microspectrométrie Raman sont multiples, mais il ne faudrait pas penser que les résultats sont pratiquement toujours assurés. C'est une technique qui s'applique au cas par cas. Les résultats obtenus montrent la variabilité qu'offre cette méthode mais ne permettent pas d'envisager des solutions globales.

Pour l'analyse de la structure moléculaire à l'échelle du μm , la microspectrométrie Raman apporte des informations inaccessibles par d'autres méthodes et se révèle la seule technique capable d'évaluer le taux de carbonatation d'une apatite et la présence de phosphate acide. Elle offre en plus l'avantage de travailler directement sur un produit sans aucune préparation (ou avec une faible préparation comme pour l'os).

Dans l'avenir, cette technique risque de devenir incontournable aussi bien pour la biologie que dans le

minéral, car un nombre croissant de publications internationales montre chaque jour de nouvelles applications.

Ce travail a été réalisé au sein de la Fédération des biomatériaux Nord - Pas de Calais soutenue par la Région Nord - Pas de Calais, la Communauté Européenne et le secrétariat d'état à la recherche.

REFERENCES

Bres E. Etude des défauts de structure des cristaux d'émail dentaire humain par microscopie électronique à résolution quasi atomique. Thèse de doctorat d'Etat Es Sciences Physiques. Université Louis Pasteur Strasbourg 1986.

Bres E., Vincent R., Morniroli J.P. and Pourroy G., Structural study of calcium phosphate ceramics by convergent beam electron diffraction. *Journal de physique IV*, november 1993, Colloque C7, supplément au journal de physique III, vol.3, 1435-1438.

Elliott J.C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. *Studies in inorganic chemistry*. Elsevier 1994

Gadaleta S.L., Pascalis E.P., Betts F., Mendelsohn R. and Boskey A.L. Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: New correlations between X-ray diffraction and infrared data. *Calcif. Tissue Int.* 1996. 58, 9-16.

Nakamoto K. Infrared spectra of inorganic and coordination compounds. Wiley-Interscience, Division of John Wiley & Sons. Second Edition.1970.

Penel G., Leroy G., Rey C., Sombret B., Huvenne J.P. and Bres E. Infrared and Raman microspectrometry study of fluor- fluor-hydroxy and hydroxyapatite powders. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. Vol. 8 1997, p.271

Penel G., Leroy G., Lu J.X., Hardouin P., Gallur A., Richart O., Descamps M., Bres E "Apport de la Microspectrométrie Raman à l'étude de la colonisation d'implants osseux de β -TCP". *ITBM* Vol. 18, N°2, 1997. p145-150

G. Penel, G. Leroy, E. F. Brès. " A New Preparation Method of Bone Sample for Raman Micro-Spectrometry". Applied Spectroscopy Vol. 52, N°2, 1998, p 312-313

Penel G. Leroy, G. Rey C., Bres E. F. "Microraman Spectral Study of Carbonated Apatites, Enamel, Dentine and Bone." Calcified Tissus Internationnal Vol.63,1998, 475-481

Penel G., Leroy N., Van Landuyt P., Flautre B., Hardouin P., Lemaitre J., and Leroy G. Raman Microspectrometry Studies of Brushite Cement: In vivo Evolution in Sheep Model. "Bone" Vol.25, N°. 2, Supplement, August 1999:1-4.

Termine J.D., Eanes E.D., Greenfield D.J., Nysten M.U. and Harperr. R.A., Hydrazine-deproteinated bone mineral, physical and chemical properties. *Calcif. tissue Res.*, 1973, 12, 73-90.

Auteur Responsable:

G. Penel

LBM Raman

tel : (33) 3 20 16 79 46

fax (33) 3 20 16 79 99

e-mail:gpenel@univ-lille2.fr

F 59000 - Lille