HAL
open science

Caractérisation du tissu osseux par spectrométrie d'absorption infrarouge

Raymonde Gibert-Jouve

To cite this version:

Raymonde Gibert-Jouve. Caractérisation du tissu osseux par spectrométrie d'absorption infrarouge. Génie civil. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 1995. Français. NNT : . tel-00843500

HAL Id: tel-00843500

https://theses.hal.science/tel-00843500v1

Submitted on 11 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JEAN MONNET
SAINT - ETIENNE

THESE

présentée par

Raymonde GIBERT - JOUVE

pour obtenir le

DIPLOME UNIVERSITAIRE DE RECHERCHE

(Spécialité : Sciences physiques)

CARACTERISATION DU TISSU OSSEUX PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION INFRAROUGE

soutenue à Saint-Etienne le 5 OCTOBRE 1995
devant la commission d'examen

composition du jury

Monsieur M. SOUSTELLE président

Messieurs C. ALEXANDRE
M. DEBOUT
B. GUILHOT
J. C PIATEK
C. REY
J. M. VERY

travail préparé au Centre "Sciences des Processus Industriels et Naturels"
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE

UNIVERSITE JEAN MONNET
SAINT - ETIENNE

A Diké
En souvenir des bonnes années que nous avons passé ensemble.
Raymonde

THESE

présentée par

Raymonde GIBERT - JOUVE

pour obtenir le

DIPLOME UNIVERSITAIRE DE RECHERCHE

(Spécialité : Sciences physiques)

CARACTERISATION DU TISSU OSSEUX PAR SPECTROMETRIE D'ABSORPTION INFRAROUGE

soutenue à Saint-Etienne le 5 OCTOBRE 1995
devant la commission d'examen

composition du jury

Monsieur M. SOUSTELLE **président**

Messieurs C. ALEXANDRE
M. DEBOUT
B. GUILHOT
J. C PIATEK
C. REY
J. M. VERY

travail préparé au Centre "Sciences des Processus Industriels et Naturels"
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE

Cette thèse a été effectuée dans les locaux de l'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES de SAINT-ETIENNE. Je remercie Monsieur Philippe HIRTZMAN, Directeur de l'Ecole ainsi que Monsieur René LALAUZE, Directeur du centre SPIN d'avoir donné leur autorisation pour la réalisation de cette étude

Ce travail n'aurait jamais pu être réalisé sans une volonté de coopération entre des personnes possédant des compétences dans des disciplines apparemment aussi différentes que sont la médecine, la biologie et les sciences physiques.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur C. ALEXANDRE, médecin, Professeur à l'UNIVERSITE JEAN MONNET de SAINT-ETIENNE et Directeur du Laboratoire Biologique du Tissu Osseux (LBTO) d'avoir accepté cette co-direction. Ses conseils avisés m'ont permis une réflexion lors de la rédaction de ce mémoire.

Monsieur B. GUILHOT également co-directeur, Directeur de Recherche à l'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE et Directeur Adjoint du centre « Sciences des Processus Industriels et Naturels » (SPIN), est à l'origine de cette coopération. Il a toujours manifesté beaucoup d'intérêt pour cette étude et, par les conseils judicieux qu'il m'a prodigués au quotidien, m'a amené au terme de ce mémoire. Qu'il en soit sincèrement remercié.

Que Monsieur M. DEBOUT, médecin, Professeur à l'UNIVERSITE JEAN MONNET de SAINT-ETIENNE et Directeur de l'Institut Medico-Legal (IML) soit remercié d'avoir permis la réalisation d'une partie de cette étude en procurant les matériaux biologiques et aussi de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Toute coopération dans des domaines différents nécessitent un coordonnateur. J. M. VERY a été le véritable lien entre toutes les personnes concernées. Sa compétence et son expérience, dans le domaine physico-chimique, alliée à son appartenance, à un certain moment, au LBTO, m'ont permis d'acquérir des connaissances dans un domaine qui ne m'était pas familier. De plus, j'ai beaucoup apprécié ses encouragements et ses qualités humaines. Sincèrement, je l'en remercie.

Je suis sensible à l'honneur que me fait Monsieur M. SOUSTELLE, Professeur, Directeur Adjoint de l'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES et Directeur de la Recherche, en participant à ce jury. Je lui prie de recevoir l'expression de ma reconnaissance.

Qu'il me soit permis de témoigner de ma profonde gratitude à Monsieur C. REY, Professeur à l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE d'avoir accepté de porter un jugement sur la partie physico-chimique de cette étude et de me faire l'honneur de participer à ce jury.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur J.C PIATEK qui assure actuellement des fonctions administratives importantes dans le milieu hospitalier, de faire partie de ce jury. Ses fonctions précédentes de gestion du personnel, au sein de l'école des mines, ont favorisé ce type d'étude en relation avec l'Université de Saint-Etienne.

Mes remerciements vont tout naturellement à Madame Anne-Marie VERNAY pour son aide et sa compétence dans le domaine théorique et expérimental de diffraction des Rayons X mais aussi pour son amitié de plus de 20 ans qui m'a été d'un précieux réconfort dans des moments difficiles.

Je tiens à exprimer mes remerciements à ceux qui ont apporté leur indipensable contribution à l'élaboration de cette étude : Madame Françoise VALDIVIESO-GELEBART pour l'amabilité et le soin avec lesquels elle m'a aidée dans la réalisation du couplage ATG-spectrométrie de masse, à Monsieur Paul JOUFFREY pour la manipulation en microscopie à balayage effectuée avec compétence et le sourire en plus, à Monsieur Norbert LAROCHE du LBTO pour le soin apporté dans le travail délicat des déminéralisations de l'os.

Je remercie Mesdames Nathalie BERNE et Joëlle VERNEY ainsi que Monsieur Alain LALLEMAND pour leur aide et leur esprit de bonne camaraderie.

Une atmosphère plaisante est évidemment un élément nécessaire dans le milieu du travail, aussi j'adresse un clin d'oeil à tous ceux qui participent au cérémonial du café.

Enfin, je ne voudrai pas oublier dans ces remerciements mon mari et mes enfants qui ont montré beaucoup de tolérance et de compréhension lors de la rédaction de ce mémoire, en partie effectuée à la maison. Aujourd'hui, je leur dis *merci*.

table des matières

CHAPITRE I

I - GENERALITES ET BIBLIOGRAPHIE

pages

1 - L'OS : GENERALITES 1

2 - LES CONSTITUANTS DES TISSUS OSSEUX 2

2-1. LE MINERAL DES TISSUS OSSEUX 2
2-1-1. Généralités : les phosphates de calcium 2
2-1-2. Hydroxyapatite et apatites non stoechimétriques (s-OHAP et ns-OHAp) 3
2-1-3. Phosphate octacalcique (OCP) 5
2-1-4. Phosphate dicalcique dihydrate, brushite (DCPD) 6
2-1-5. Phosphate tricalcique et Whitlockite (TCP) 6
2-1-6. Phosphate de calcium amorphe (ACP) 7

2-2. LA MATRICE ORGANIQUE DES TISSUS OSSEUX 8
2-2-1. Le collagène 8
2-2-2. La matrice non collagénique 9

2-3. LES CELLULES DU TISSU OSSEUX 9
2-3-1. Les ostéoblastes 9
2-3-2. Les ostéocytes 10
2-3-3. Les ostéoclastes 11
2-3-4. Les autres cellules du tissu osseux 11

3 - LE MECANISME DE RESORPTION DE L'OS 12

4 - LES DIFFERENTES TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES D'ETUDES DE L'OS 13

4-1. LA DIFFRACTION DES RAYONS X (DRX) 13

4-2. LA TECHNIQUE DE SPECTROMETRIE INFRAROUGE 14
4-2-1. Notions d'ordre cristallin 14
4-2-2 La spectrométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) 15

4-2-2-1 généralités 15
4-2-2-2 Principe 15
4-2-2-3 La réflexion diffuse 17
4-2-2-4 La FTIR-microscopie 18

5 - L'ANALYSE DU TISSU OSSEUX PAR IRTF

5-1. LE MINERAL 20

5-2. LA MATIERE ORGANIQUE 20

5-3. LES PROBLEMES ANALYTIQUES 20

CONCLUSIONS 22

CHAPITRE II

II - MATERIELS ET METHODES

pages

1 - LES MATERIAUX ECHANTILLONNES 23

1-1. LE MATERIEL HUMAIN 23
1-1-1. Provenance 23
1-1-2. Prélèvement et conditionnement 23
1-1-3. Conditions d'analyse 23

1-2. LE MATERIEL ANIMAL 24
1-2-1. Expérimentation en microgravité 24
1-2-2. Prélèvement et conditionnement 25

1-3. MISE EN FORME DE L'ECHANTILLON 25

2 - INSTRUMENTATION ET METHODES 26

2-1. LA SPECTROMETRIE IRTF 26
2-1-1. Le matériel 26
2-1-2. La méthode 26
2-1-2-1 l'acquisition des spectres 26
2-1-2-2 l'observation et le traitement des spectres 28

2-2. L'ANALYSE THERMIQUE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE IRTF 29
2-2-1. Le matériel 29
2-2-1-1 l'analyse thermique
2-2-1-2 la spectrométrie infrarouge - compartiment gaz - 30
2-2-2. Le couplage TGA-FTIR 32

2-3. LA MICROSCOPIE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE IRTF 32

2-4. LES TECHNIQUES ANNEXES 32
2-4-1. La diffraction RX 32
2-4-2. Le couplage ATG-SPECTROMETRIE DE MASSE 33

CHAPITRE III

III - RESULTATS

pages

1 - LES ETALONS 34

1-1. PROVENANCE DES ETALONS 34

1-2. LES SPECTRES IR DES PHOSPHATES DE CALCIUM 35

1-3. L'HYDROXYAPATITE - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$- 37

1-4. L'OCTACALCIUM PHOSPHATE - $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4, 5H_2O$- 39

1-5. L'HYDROGENOPHOSPHATE DE CALCIUM DIHYDRATE - $Ca\ HPO_4, 2H_2O$- 42

1-6. L'HYDROGENOPHOSPHATE DE CALCIUM - $Ca\ HPO_4$- 43

1-7. LES AUTRES PHOSPHATES 44

1-8. LE CARBONATE DE CALCIUM (calcite) - $Ca\ CO_3$ 44

2 - L'IRTF ET L'OS HUMAIN 46

2-1. LES PRINCIPALES BANDES IR DE L'OS TRABECULAIRE 46

2-2. INFLUENCE DE LA METHODE D'ACQUISITION 48

2-2-1. En réflexion diffuse - acquisition directe - 48

2-2-2. En réfexion diffuse - sur support abrasif - 48

2-2-3. En réflexion - microscopie / IRTF - acquisition directe - 48

2-2-4. Commentaires 50

2-3. L'HETEROGENEITE 53

2-4. LA LOCALISATION DE L'OS 53

2-5. L'AGE 55

2-6. L'ACQUISITION ET LE FACTEUR TEMPS 59

2-7. LA PATHOLOGIE 60

2-8. LE TRAITEMENT MATHEMATIQUE DES SPECTRES IR **63**
2-8.1. Les déconvolutions 63
2-8-1-1. La région 1200-800 cm^{-1} 64
2-8-1-2. Intérêts de la déconvolution 67
2-8-2. Les désommations 68
2-8-3. Tableaux récapitulatifs de ces traitements 71

3 - L'IRTF ET L'OS DE RAT **76**

3-1. L'EXPERIMENTATION EN MICROGRAVITE **76**
3-1-1. Réflexion diffuse - acquisition directe - 77
3-1-1-1. L'os trabéculaire 77
3-1-1-2. L'os cortical 79
3-1-1-3. L'os trabéculaire et l'os cortical 80
3-1-2. Les déconvolutions - os cortical - 82

3-2. ESSAIS DE NORMALISATION DES SPECTRES **87**
3-2-1. La région 1200-800 cm^{-1} 87
3-2-2. La région 900-850 cm^{-1} 93
3-2-3. La région 1420-1370 cm^{-1} 98

4 - L'IRTF ET L'ANALYSE DES GAZ **100**

4-1. LE COUPLAGE ATG - FTIR **100**

4-2. LES SPECTRES DES GAZ OBSERVES **101**

4-3. LES DEPARTS DE L'ENSEMBLE DES GAZ (« chromatograms ») **104**

4-4. LES DEPARTS DES GAZ **106**

5 - LES TECHNIQUES ANNEXES **113**

5-1. LE COUPLAGE ATG - SPECTROMETRIE DE MASSE **113**

5-2. L'ANALYSE THERMOGRAVIMETRIQUE **119**

5-3. L'ANALYSE PAR DIFFRACTION X **125**

CHAPITRE IV

IV - COMMENTAIRES ET CONCLUSIONS

pages

1 - LA MECONNAISSANCE DU TISSU OSSEUX **126**

1-1. LES DIFFERENTES SUBSTIUTIONS DU MINERAL **126**

1-2. LA SOLUBILITE ET LE PRODUIT DE SOLUBILITE DES CaP **127**

1-3. LA NUCLEATION ET LA CROISSANCE CRISTALLINE **129**

1-4. LA CARACTERISATION **130**

2 - PERSPECTIVES D'APPLICATIONS DE LA SPECTROMETRIE INFRAROUGE DANS LA CARACTERISATION DES TISSUS CALCIFIES **131**

2-1. LES MODES DE TRANSMISSION **131**
2-1-1. Le pastillage 131
2-1-2. Les émulsions 131
2-1-3. Les films et les dépôts 131

2-2. LES MODES DE REFLEXION **132**
2-2-1. La réflexion diffuse 132
2-2-2. La réflexion totale atténuée (ATR) 132
2-2-2-1. Eléments de théorie 132
2-2-2-2. Applications de l'ATR 134

3 - L'OS ET L'ECONOMIE **136**

3-1. LE COÛT DE LA SANTE **136**

3-2. LES SUBSTITUTS OSSEUX **136**

CONCLUSION GENERALE

INDEX DES FIGURES

N°		page
1	STRUCTURE DES APATITES	4
2	ACCESSOIRE DE REFLEXION DIFFUSE	19
3	COUPLAGE ANALYSE THERMIQUE/SPECTROMETRIE DE MASSE	31
	schéma de montage	
	COUPLAGE ANALYSE THERMIQUE/SPECTROMETRIE ABSORPTION INFRAROUGE	31
	compartiment de la cellule de gaz du FTS 40 de BIORAD	
4	HYDROXYAPATITE	38
5	OCTACALCIUM PHOSPHATE	40
6	CALCIUM HYDROGENE PHOSPHATE DIHYDRATE - BRUSHITE -	42
7	CALCIUM HYDROGENE PHOSPHATE - MONETITE -	43
8	CALCIUM CARBONATE -CALCITE-	44
9	OS TRABECULAIRE	46
10a et10 b:	INFLUENCE DE LA PREPARATION ET DU MODE D'ACQUISITION	49
10c et 10 d :	INFLUENCE DE LA PREPARATION	51-52
11	HETEROGENEITE - MICROSCOPIE/FTIR	53
12	INFLUENCE DE LA LOCALISATION - HOMME -	54
13	INFLUENCE DE LA LOCALISATION - FEMME -	54
14a et 14b :	INFLUENCE DE L'AGE - OS TRABECULAIRE - HOMMES -	55-56
15a et 15b :	INFLUENCE DE L'AGE - OS TRABECULAIRE - FEMMES -	56-57
16a et 16b :	INFLUENCE DE L'AGE - OS TRABECULAIRE - HOMMES -	58
17	L'ACQUISITION ET LE FACTEUR TEMPS	59
18a, 18b, 18c et 18d :	INFLUENCE DE LA PATHOLOGIE	60-61-62
19, 20, 21 et 22 :	DECONVOLUTIONS - HOMMES -	65-66
23	DECONVOLUTION - FEMME -	67
24, 25 et 26 :	DESOMMATIONS - HOMMES -	68-69
27	DESOMMATION - FEMME -	70
30	REPRODUCTIBILITE - OS TRABECULAIRE - SERIE LO -	77
31	REPRODUCTIBILITE - OS TRABECULAIRE - SERIE SC RO -	77

32 REPRODUCTIBILITE - OS TRABECULAIRE - SERIE F RO - 78

33 REPRODUCTIBILITE - OS TRABECULAIRE - SERIE VC RML - 78

34 REPRODUCTIBILITE - OS TRABECULAIRE - SERIE SC RML - 78

35 REPRODUCTIBILITE - OS TRABECULAIRE - SERIE F RML - 78

36 REPRODUCTIBILITE - OS CORTICAL - SERIE LO - 79

37 REPRODUCTIBILITE - OS CORTICAL - SERIE SC RO - 79

38 REPRODUCTIBILITE - OS CORTICAL - SERIE F RO - 79

39 REPRODUCTIBILITE - OS CORTICAL - SERIE VC RML - 79

40 REPRODUCTIBILITE - OS CORTICAL - SERIE SC RML - 80

41 REPRODUCTIBILITE - OS CORTICAL - SERIE F RML - 80

42 RAT 12 VC RML : OS TRABECULAIRE ET OS CORTICAL 80

43 DECONVOLUTION - 1200-800 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE LO - 82

44 DECONVOLUTION - 1200-800 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE SC RO - 83

45 DECONVOLUTION - 1200-800 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE VC RML - 83

46 DECONVOLUTION - 1200-800 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE F RO - 84

47 DECONVOLUTION - 1200-800 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE SC RML - 85

48 DECONVOLUTION - 1200-800 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE F RML - 85

49 REGION 1200-800 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE F RML 87

50 HISTOGRAMMES- 1200-800 cm^{-1} - SERIE LO - 89

51 HISTOGRAMMES - 1200-800 cm^{-1} - SERIE SC RO - 89

52 HISTOGRAMMES - 1200-800 cm^{-1} - SERIE VC RML - 90

53 HISTOGRAMMES - 1200-800 cm^{-1} - SERIE F RO - 90

54 HISTOGRAMME GENERAL - 1200-800 cm^{-1} - 92

55 DECONVOLUTION - 900-850 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE LO - 93

56 DECONVOLUTION - 900-850 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE SC RO - 94

57 DECONVOLUTION - 900-850 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE F RO - 94

58 DECONVOLUTION - 900-850 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE VC RML - 95

59 DECONVOLUTION - 900-850 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE SC RML - 95

60 DECONVOLUTION - 900-850 cm^{-1} - OS CORTICAL - SERIE F RML - 96

61 DECONVOLUTION - 900-850 cm^{-1} - OS CORTICAL - TOUTES SERIES - 96

62 HISTOGRAMMES - 1430-1370 cm^{-1} - 99

63 COUPLAGE ATG-FTIR - OS TRABECULAIRE 102

64 COUPLAGE ATG-FTIR - OS TRABECULAIRE - GENERAL - 102

65 COUPLAGE ATG-FTIR - OS CORTICAL 103

66 COUPLAGE ATG-FTIR - OS CORTICAL - GENERAL - 103

67 COUPLAGE ATG-FTIR - OS CORTICAL - « CHROMATOGRAM » 105

68 COUPLAGE ATG-FTIR - OS TRABECULAIRE - « CHROMATOGRAM » 105

69 COUPLAGE ATG-FTIR - OS CORTICAL - 12 VC RML 107

70 COUPLAGE ATG-FTIR - OS CORTICAL - 17 F RO 108

71 COUPLAGE ATG-FTIR - OS CORTICAL - 29 F RML 109

72 COUPLAGE ATG-FTIR - OS TRABECULAIRE - 12 VC RML 110

73 COUPLAGE ATG-FTIR - OS TRABECULAIRE - 17 F RO 111

74 COUPLAGE ATG-FTIR - OS TRABECULAIRE - 6 SC RO 112

75, 75a et 75b : COUPLAGE ATG-SM - OS TRABECULAIRE - 14 VC RML 114-115-116

76, 76a et 76b : COUPLAGE ATG-SM - OS CORTICAL - 14 VC RML 114-115-116

77 ATG - OS TRABECULAIRE - 17 F RO 121

78 ATG - OS CORTICAL - 17 F RO 122

79 ATG - OS TRABECULAIRE - 25 SC RML 123

80 ATG - OS TRABECULAIRE - 29 F RML 124

SOMMAIRE DES ANNEXES

LA SPECTROMETRIE D'ABSORPTION INFRAROUGE **annexe 1**
généralités
exemple du dioxyde de carbone et de l'eau
la symétrie moléculaire - calcul des fréquences -
l'oscillateur harmonique
les fréquences des groupes - relation entre l'intensité et la concentration
nomenclature des types de vibrations

L'ANALYSE THERMOGRAVIMETRIQUE - GENERALITES - **annexe 2**

LA SPECTROMETRIE DE MASSE **annexe 3**
généralités
principe
domaines d'applications

PHOTOGRAPHIE - MICROSCOPE A BALAYAGE - **annexe 4**

MATERIAUX DE REFERENCE **annexe 5**
hydroxyapatite préparée au laboratoire et produit ALDRICH

LES DEMINERALISATIONS **annexe 6**
os trabéculaire - déminéralisation avec l'acide trichloracétique
os trabéculaire - déminéralisation avec acide + formol
os trabéculaire - déminéralisation avec EDTA
os cortical - déminéralisation avec l'acide trichloracétique
os cortical - déminéralisation avec acide + formol

EXEMPLE DE CALCUL DES AIRES - REGION 1420- 1370 cm^{-1} **annexe 7**
série LO
série SC RO
série VC RML
série F RO
série SC RML
série F RML

% DES AIRES - REGION 1200-800 cm-1 - VCRML et F RO **annexe 8**

COUPLAGE ATG-SPECTROMETRIE DE MASSE **annexe 9**
tableau général de l'os cortical du rat 14 VC RML
tableau général de l'os trabéculaire du rat 14 VC RML

ANALYSE THERMOGRAVIMETRIQUE **annexe 10**
influence de l'état de division et de la quantité de matière sur la température

ANALYSE PAR DIFFRACTION DES RAYONS X **annexe 11**
contrôle de l'octacalcium phosphate préparé au laboratoire

LES PROTEINES MORPHOGENETIQUES CONNUES **annexe 12**

chapitre 1

I - GENERALITES ET BIBLIOGRAPHIE

Cette étude a pour but l'étude de l'os minéralisé et de sa matrice par spectrométrie d'absorption infrarouge.

Afin de mieux insérer notre travail dans le domaine physico-chimique de l'os un rappel bibliographique est brièvement présenté.

1 - L'OS : GENERALITES (1)

L'os est un tissu conjonctif qui constitue, avec le cartilage, le squelette. Les os assurent trois fonctions : (1) *support mécanique* et site d'attachement du muscle pour la locomotion , (2) *protectrice* pour les organes vitaux et la moelle osseuse et (3) *métabolique* : réserve ionique pour tout l'organisme, spécialement en *calcium* et en *phosphate*.

Les constituants fondamentaux des tissus conjonctifs sont les *cellules* et la *matrice extracellulaire*. Cette dernière est particulièrement abondante dans l'os et se compose de fibres de collagène, de protéines non collagéniques et de substances non protéiniques. Cette matrice a la possibilité de se *calcifier*.

Anatomiquement on peut distinguer deux types d'os dans le squelette : les os plats (côte, mandibule, iliaque...) et les os longs (tibia, fémur, humérus) qui dérivent de deux types distincts d'histogénèses (intramembranaire et endochondrale) bien que le développement et la croissance des os longs comportent les deux types à la fois.

L'examen externe d'un os long montre deux extrémités plus larges (épiphyses), au milieu un tube plus ou moins cylindrique (diaphyse) et un passage progressif de l'un à l'autre (métaphyse). Pendant la croissance d'un os long, l'épiphyse et la métaphyse sont séparés par une bande de cartilage, *le cartilage épiphysaire* : des cellules prolifèrent puis la matrice se calcifie. Cette couche de cellules proliferatrices et la matrice cartilagineuse sont responsables de la croissance longitudinale et devient, à la fin de la période de croissance, entièrement calcifiée et remodelée. La partie externe des os est formée par une épaisse et dense couche de tissu calcifié : le cortex *(os cortical)* qui, dans la diaphyse, entoure la cavité. Vers les métaphyses et les épiphyses, le cortex devient progressivement plus fin et l'espace interne est rempli avec de fines trabécules calcifiées : *l'os trabéculaire*. Les surfaces osseuses aux extrémités qui prennent part à la jointure articulaire sont recouvertes d'une couche de cartilage articulaire qui ne se calcifie pas.

L'os cortical et l'os trabéculaire présentent de grandes similitudes mais avec des différences structurelles et fonctionnelles. Les différences structurelles sont essentiellement

quantitatives : 80-90 % du volume de l'os cortical est calcifié contre 15-25 % dans l'os trabéculaire (le volume restant étant occupé par la moelle osseuse, les vaisseaux sanguins et le tissu conjonctif) mais 70-85 % de l'interface avec les tissus mous est une surface osseuse endostéale. Les différences fonctionnelles sont une conséquence de ces différences structurelles et vice-versa : *l'os cortical remplit principalement les fonctions mécaniques et protectrices et l'os trabéculaire la fonction métabolique.*

Suivant l'âge et le sexe des changements de masse osseuse peuvent avoir lieu. Il est admis qu'au cours de la vie, l'os périostéale est continuellement déposé alors que s'opère une érosion croissante dans l'enveloppe subcorticale vers le milieu de la vie. L'effet cumulé de ces deux changements est une lente mais mesurable augmentation du diamètre externe de l'os long tandis que l'épaisseur du cortex est notablement réduite. La masse de l'os trabéculaire diminue graduellement dès le début de l'âge adulte. Chez la femme, une diminution brutale de cette masse osseuse survient lors de la ménopause. Similairement l'os cortical diminue mais à des échéances plus lointaines (MERZ and SHENK 1970, MELSEN et al 1978).

Histologiquement l'os est formé de quatre composants majeurs : le collagène, la matrice organique non collagénique, les cellules et la matière minérale.

En conclusion, l'os est formé par des fibres de *collagène* (surtout de type I, 90 % des protéines totales), généralement orientées dans une direction préférentielle, de protéines non collagéniques et aussi de substances non protéiniques comme les phospholipides. Des cristaux d'*hydroxyapatite* $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ se trouvent en surface et à l'intérieur des fibres de collagène ainsi que dans la substance fondamentale. Ils sont généralement orientés avec leur axe d'élongation parallèle à l'axe c, dans la même direction préférentielle que les fibres de collagène.

2 - LES CONSTITUANTS DES TISSUS OSSEUX

2-1. LE MINERAL DES TISSUS OSSEUX

2-1-1. GENERALITES : LES PHOSPHATES DE CALCIUM

Les orthophosphates de calcium sont des sels de l'acide phosphorique H_3PO_4 qui forment des composés qui contiennent des ions $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}, ou PO_4^{3-}. Ceux qui contiennent les ions $H_2PO_4^-$, se forment seulement en milieu plutôt acide et ne se trouvent donc pas généralement dans les systèmes biologiques. Dans les os et les dents ainsi que dans diverses calcifications pathologiques, on trouvera les ions HPO_4^{2-}, ou PO_4^{3-}. Quelques phosphates de calcium sont hydratés et ceux qui appartiennent à la famille des phosphates de calcium à base apatitique contiennent des ions OH^-. Les pyrophosphates ($P_2O_7^{4-}$ dipolyphosphate) peuvent se rencontrer en pathologie articulaire, dans la pseudogoutte. Les polyphosphates qui contiennent des liaisons P-O-P sont d'importance biologique moindre que les orthophosphates. Il est à noter que les pyrophosphates sont des inhibiteurs de nucléation et de croissance cristalline dans les systèmes aqueux CaPs (phosphate de

calcium) et se forment parfois lors du chauffage des hydrogénophosphates ce qui permet dans certains cas de mettre en évidence indirectement la présence de ces derniers. Les pyrophosphates sont vite dégradés par voie enzymatique contrairement à des composés proches : les biphosphonates, caractérisés par des liaisons P-C-P. Ceux-ci sont très utilisée dans l'industrie du médicament.

Les CaPs sont des solides blancs. Ils sont très peu solubles dans l'eau mais ils se dissolvent dans tous dans les acides. La préparation ainsi que la structure définie par la diffraction des Rayons X (DRX) et la spectrométrie d'absorption infrarouge de ces composés lorsqu'ils sont *isolés* sont relativement bien connues ***(2).***

Les diagrammes de phase indiquent les phases stables thermodynamiquement et donnent une indication sur les conditions requises pour les synthèses. Cependant, la phase qui se forme sous des conditions données est souvent dictée par des considérations cinétiques plutôt que thermodynamiques.

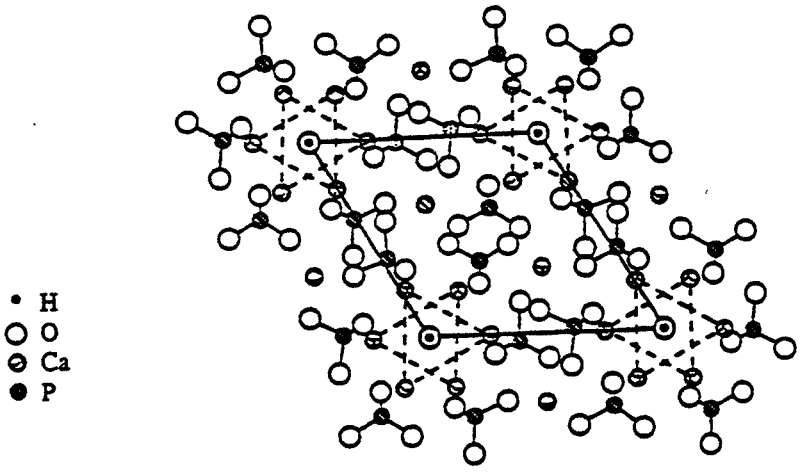
Les apatites ont comme formule générale $Ca_5(PO_4)_3X$ ou $X = F^-$ (fluorapatite, FAp), OH^- (hydroxyapatite, OHAp), ou Cl^- (chlorapatite, ClAp) (**figure 1**). La structure apatitique, définie par une maille bimoléculaire, se prête bien aux substitutions ioniques et les ions Ba^{2+} , Sr^{2+} ou Pb^{2+} peuvent remplacer partiellement ou totalement les ions Ca^{2+} . De même les ions PO_4^{3-} peuvent être remplacés par les ions AsO_4^{3-}. Des solutions solides d'halogénures et d'ions OH^- sont fréquentes (exemple : OH,FAp ; Cl,OHAp).

On trouve très souvent des substitutions couplées chez les apatites. Un ion est remplacé par un autre de même signe mais de charge différente, la neutralité est maintenue par substitution d'autres ions ou des défauts. Les CO_3Aps sont un exemple complexe de ces substitutions et ont fait l'objet de nombreuses controverses. La nonstoechiométrie, avec des sites vacants dans le réseau est presque générale dans les apatites biologiques.

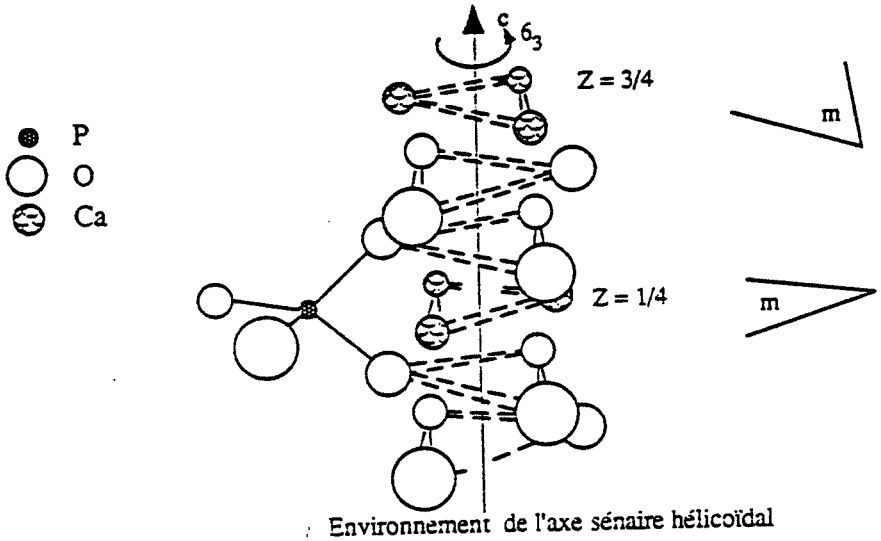
La structure apatitique de base, représentée par la fluorapatite, est hexagonale avec un groupe d'espace $P6_3/m$ et les paramètres approximatifs du réseau sont a = 9,4 Å et c = 6,9 Å avec deux groupements par unité de base. Des substitutions dans le réseau peuvent provoquer un abaissement de la symétrie, ainsi l'unité de cellule peut doubler (généralement a, mais quelquefois c) et/ou une distortion légère de l'hexagonale peut se produire. Ces changements dans la symétrie dépendent souvent de la stoechiométrie de l'apatite et, comme nous le verrons plus loin, pourront être mis en évidence par l'apparition de bandes nouvelles en spectrométrie infrarouge.

2-1-2. HYDROXYAPATITE et n-s APATITE

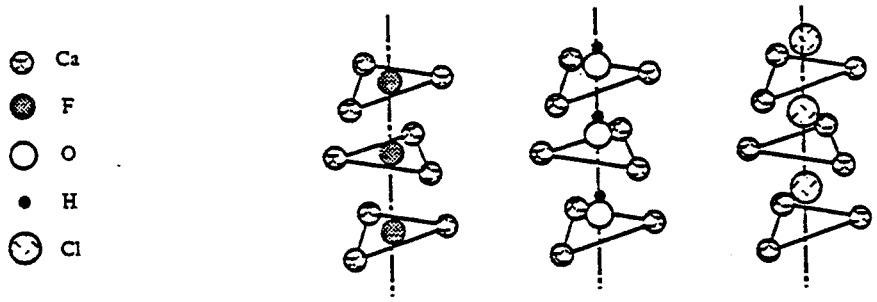
l'hydroxyapatite, de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. s-OHAp (apatite stoechiométique) est monoclinique avec $a = 9{,}421$, $b = 2a$, $c = 6{,}881$ Å , $\gamma = 120°$ ***(3).*** Elle reste toutefois indicée dans le système hexagonal. L'apatite sert souvent de modèle pour le minéral des os et des dents. De plus, économiquement elle présente un intérêt commercial dans les matériaux de remplacements des os (polymères et biocéramiques). Il existe de très nombreuses publications et ouvrages sur les structures apatitiques parmi lesquelles il faut citer l'ouvrage de synthèse de J.C ELLIOT ***(4).*** Ce rappel bibliographique s'en inspire largement .



Projection sur le plan de base (001)



Environnement de l'axe sénaire hélicoïdal



fluorapatite hydroxyapatite chlorapatite

Différents ions sur l'axe sénaire hélicoidal

STRUCTURE DES APATITES

figure 1.

L'hydroxyapatite stoechiométrique (s-OHAp) ne présente pas beaucoup d'intérêt en elle-même pour les matériaux biologiques naturels puisque le minéral constituant les os et les dents présenterait plutôt les caractéristiques d'une ns-OHAp (hydroxyapatite non stoechiométrique) avec de très nombreuses substitutions d'ions à l'intérieur du réseau. On a essayé d'expliquer les variations des rapports molaires Ca/P des Ca-def OHAp (de 1,5 à 1,67) ***(5, 6, 7)***. Ces apatites incluent des phases non détectées, des absorptions et/ou des adsorptions de surface, des substitutions de réseau et souvent des mélanges intercristallins d'OHAp et de phosphate octacalcique (OCP). Les phases possibles pourraient être l'OCP (dont le diffractogramme RX est presque semblable à l'OHAp sauf pour la raie la plus intense (petit angle à 18 Å), le phosphate de calcium amorphe (ACP) et le phosphate dicalcique dihydrate ou brushite (DCPD). Les substitutions dans le réseau sont très courantes et l'on trouve, suivant les cas, de très nombreuses traces d'éléments du tableau périodique dans les tissus osseux. La facilité des échanges étant favorisée par les tunnels du réseau apatitique.

L' hydroxyapatite non stoechiométrique (exempte de CO_3^{2-}) peut inclure l'eau du réseau, des ions HPO_4^{2-}, Ca^{2+} et/ou $2OH^-$ remplacés par O^{2-}. Le phosphate de calcium précipité, Ca-def OHAp, exempt de CO_3^{2-}, a un rapport molaire Ca/P est compris entre 1,66 et 1,5 ou moins.

Suivant que la substitution des carbonates s'effectuent au dépens des hydroxydes ou des phosphates, l'apatite prend le nom d'apatite carbonatée de type A ou de type B. A-CO_3Ap est une carbonate apatite type A qui idéalement aurait comme formule $Ca_{10}(PO_4)_6CO_3$. B- CO_3Ap est une carbonate apatite type B, dans laquelle les ions PO_4^{3-} sont remplacés par des ions CO_3^{2-} . AB- CO_3AP est un carbonate apatite contenant à la fois les deux substitutions précédentes. Dans les os, on peut envisager la possibilité de toutes ces substitutions. La spectrométrie d'absorption infrarouge permet de mettre en évidence ces diverses substitutions (dans le cas où la matière organique n'interfère pas dans le domaine des carbonates).

2-1-3. LE PHOSPHATE OCTOCALCIQUE (OCP)

De formule $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4,5H_2O$, son réseau est triclinique avec a = 19,692, b = 9,523, c = 6,835 Å et α = 90,15, β = 92,54 et γ = 108,65°. Les couches "apatitiques" (environ 1,1 nm d'épaisseur alternent avec des couches "hydratés" ou "d'eau" parallèles à (100). La présence de cette couche apatitique explique les similitudes des paramètres du réseau avec ceux de l'OHAp (a = 9,417 et c = 6,881 Å).

Au laboratoire l'OCP est souvent présenté comme un intermédiaire dans la précipitation de l'OHAp qui est plus stable thermodynamiquement. L'OCP germe puis croît plus facilement que l'OHAp. La connaissance de mécanisme de croissance de l'OCP et de l'hydrolyse pourrait être très importante pour la compréhension des mécanismes de minéralisation dans les os et les dents. La structure imbriquée de l'OCP et de l'OHAp a été utilisée pour expliquer l'incorporation (via l'hydrolyse) d'impuretés, en particulier d'ions CO_3^{2-} , Mg^{2+} et Na^+ et, en conséquence, la non-stoechiométrie des apatites précipitées.

Suivant la disponibilité d'ions Ca^{2+}, nous aurons les deux réactions :

$$Ca_8H_2(PO_4)_6,5H_2O + 2\ Ca^{2+} = 2\ Ca_5(PO_4)_3OH + 3\ H_2O + 4H^+$$

$$1{,}25\ Ca_8H_2(PO_4)_6,5H_2O = 2\ Ca_5(PO_4)_3OH + 1{,}5\ H_3PO_4 + 4{,}25\ H_2O$$

La grande similitude des diffractogrammes RX des différents phosphates de calcium ainsi que les nonstoechiométries, la très faible cristallisation de certains phosphates et les juxtapositions ou mélanges de tous ces composés (sans oublier la présence de la matière organique) dans le cas des os ne facilitent pas l'interprétation...

2-1-4. LE PHOSPHATE DICALCIQUE DIHYDRATE (DCPD)

De formule $CaHPO_4$, $2H_2O$, son réseau est monoclinique avec a = 5,812, b = 15,180, c = 6,239 Å et β = 116,25°. La piézoélectricité du DCPD signifie qu'il n'a pas comme on l'avait cru une structure centro symétrique. On trouve la présence du DCPD nommé aussi brushite, en petites quantités sur des incrustations d'anciens os ainsi que dans des calcifications pathologiques. La brushite a été proposé comme un intermédiaire dans la minéralisation apatitique et les procédés de dissolution ***(8)***.

L'ultime produit formé par l'hydrolyse du DCPD est l'OHAp mais contrairement à l'OCP, les cristaux formés n'ont pas la même configuration spatiale que le matériau de départ. Les cinétiques de cette réaction et la formation des composés intermédiaires ont été étudiées ***(9 à 13)***. L'hydrolyse en OCP se trouve dans un intervalle de pH compris entre 6,2 et 7,4 entre 25 et 37° C, mais pour les plus fortes valeurs de pH e/ou de températures, ce sont les composés apatitiques qui se forment***(12)***. Au-dessus du point singulier DCPD/OHAp on devrait avoir l'hydrolyse en OHAp (forme stable) qui ne se produit pas car la vitesse de croissance de l'OHAp est trop faible (sauf pour les pH élevés et/ou pour les températures élevées). Cependant à pH supérieur au point singulier DCPD/OCP, l'OCP a une plus faible solubilité que le DCPD et croît beaucoup plus vite que l'OHAp et c'est l'OCP qui s'hydrolyse. La vitesse de réaction d'hydrolyse est fortement influencée par la présence d'ions F^-. Ces ions peuvent aussi favoriser la formation d'OHAp. La whitlockite (voir plus loin la définition de ce composé) peut aussi se former en présence d'ions Mg^{2+}.

Des études par DRX n'ont pas pu montrer la présence de brushite dans les os de bovins ou de poulets ***(14-15)***. mais des études ***(15)*** par RMN ^{31}P *MASS*) indiquent la présence de deux composés principaux dans l'os : une hydroxyapatite faiblement cristallisée et un composé mineur dont le spectre ressemble à celui du DCPD.

2-1-5. LE PHOSPHATE TRICALCIQUE -WHITLOCKITE- (TCP)

De formule $Ca_3(PO_4)_2$, seul le β-TCP est stable à température ambiante. Il cristallise dans le système rhombohédrique avec a = 10,439, c = 37,375 Å . Le β-TCP ne se forme pas dans les systèmes aqueux dans les conditions normales du laboratoire à l'inverse de la whitlockite.

Whitlockite et β-TCP (même formule et même DRX) étaient souvent confondus mais de subtiles différences structurelles entre ces deux composés ont été mises en

évidence. Actuellement on réserve le terme de Whitlockite au minéral ou au matériau synthétique similaire dans lesquels les ions Mg^{2+} et HPO_4^{2-} jouent un rôle structurel et le terme de β-TCP au polymorphe basse température dans lequel les ions Mg^{2+} et HPO_4^{2-} sont absents.

On trouve la Whitlockite dans des calcifications pathologiques et comme un constituant majeur des carries dentaires humains. Sa présence dans les caries dentaires a été mise en évidence par diffraction électronique. Son habitus rhomboédrique la rend très facilement reconnaissable au microscope électronique et elle est surnommée "le cristal des caries". Il est intéressant de noter parfois sa présence lors de la formation hydrothermale d'implants osseux dans des solutions de phosphate et à partir de squelettes de corail (forme, à la fois calcite et aragonite, de carbonate de calcium) ***(16)***. On penserait qu'elle serait associée à une forte concentration en magnésium qui stabiliserait sa structure.

Les spectres infrarouge montrent des différences entre l'α-TCP et le β-TCP mais aussi entre le β-TCP et la Whitlockite synthétique avec une bande à 850 cm^{-1} pour ce dernier ***(17)***. Les régions 575-600 cm^{-1} (ν_4) et 1100-1000 cm^{-1} (ν_3) ***(18-19)*** sur des spectres IR déconvolués ont mis aussi en évidence des différences entre Whitlockite et β-TCP.

Le spectre ^{31}P RMN MAS *(Magic Angle Spinning)* du β-TCP montre des changements de 0,1, 1,2 et 4,2 ppm ***(20)***.

2-1-6. LE PHOSPHATE DE CALCIUM AMORPHE (ACP)

Une mise au point faite en 1986 ***(21)*** semblerait vouloir éclaircir certaines études sur l'ACP réalisées avant 1974.

L'ACP est intéressant car on le présente souvent comme une phase de transition pendant la formation des CaPs dans les systèmes aqueux particulièrement dans OHAp non stoechiométique. Il faut aussi remarquer que le fait de ne pas avoir une structure tri-dimensionnelle rend difficile le procédé de nucléation pendant la formation des tissus calcifiés ce qui ne plaiderait pas en faveur de son rôle d'intermédiaire dans la formation de ce dernier. Cependant, en solution aqueuse et alcaline ou légèrement alcaline, après quelques heures seulement, le produit de la transformation de l'ACP est l'OHap ou ns-OHAp, le DCPD ***(22-23)*** et l'OCP ***(24)***. Certains auteurs ***(25)***, par la maturation à pH constant de 7,4 ont montré par DRX que le premier cristal formé avait un diffractogramme RX à strucure apatitique avec un paramètre *a* élevé (10,5 Å) mais l'analyse par microscopie électronique faisait plutot penser à une structure de type OCP. Des auteurs ***(26)*** ont travaillé avec une solution "saturée" d'ACP à pH 7,4, . Ils ont montré que la conversion d'hydrolyse s'opérait avec deux processus : Le premier consomme de l'acide avec la formation d'un intermédiaire acide aux propriétés de solubilité de l'OCP et dans le second procédé cet intermédiaire est converti en apatite. Il ont aussi exprimé dans le même article la possibilité de l'hydrolyse directe de l'ACP en OHAp.

Les changements de pH durant la précipitation et la transformation de l'ACP en diverses phases cristallines ont été expliqués par la formation initiale d'une phase amorphe, ACP1, suivie par la formation et la croissance d'une autre phase amorphe, ACP2 ***(27, 28,***

29). Les solubilités apparentes de l'ACP1, l'ACP2 et l'OCP sont déterminées de 303 à 315° K à partir desquelles sont calculés $\Delta G°$, $\Delta H°$ et $\Delta S°$ pour les dissolutions de ces trois phases.

Les principales techniques instrumentales utilisées sont la spectrométrie infrarouge et la specrométrie RMN. Au moyen de cette technique instrumentale, en 1983 certains auteurs ***(30)***, déduisent que l'ACP n'est ni une OHAp pauvrement cristallisée ni un mélange d'OHAp et de phases CaP contenant des ions HPO_4^{2-}, mais plutôt un composé unique et bien défini (malgré quelques petites hétérogénéités). Cette conclusion est en désaccord avec d'autres travaux effectués par spectrométrie infrarouge en 1972, 1988 et 1989 ***(31-32-33)***. Des calculs ***(34)*** en 1966 sur des diffractogrammes RX d'OHAp ont été comparés avec les diffractogrammes RX de l'ACP. La conclusion était que l'ACP est distinct de l'OHAp ce qui accréditerait les conclusions des travaux en RMN. La microscopie électronique de l'ACP montre des particules sphériques amorphes de l'ordre de 20 à 120 nm . Il a été suggéré que les grosses particules de l'ACP vues au microscope électronique présenteraient des agglomérats grossièrement sphériques de $Ca_9(PO_4)_6$ formant des aggrégats d'une manière aléatoire et dont les espaces entre les agglomérats seraient remplis d'eau ***(35)***.

En définitive la structure du minéral osseux, constamment en cours de construction et destruction est toujours un sujet d'actualité.

2-2. LA MATRICE ORGANIQUE DES TISSUS OSSEUX

2-2-1. LE COLLAGENE

Le collagène de type I (collagène de type II pour les cartilages) est une protéine fibreuse. C'est le composant le plus abondant du tissu osseux. Les principaux acides aminés constituant le collagène sont la glycine (environ un tiers), l'hydroxyproline et l'hydroxylysine. Le tropocollagène a la forme d' un bâtonnet de 3000 Å de long et de 15 Å de diamètre constitué de trois hélices enroulées les unes autour des autres pour former un câble superhélicoidal. Les trois brins sont liés les uns aux autres par des liaisons hydrogène. Les donneurs d'hydrogène sont les groupes peptidiques NH des résidus glycine et les accepteurs d'hydrogène sont les groupes CO des résidus des autres chaines. La direction de la liaison hydrogène est perpendiculaire au grand axe du bâtonnet de tropocollagène. Les groupes hydroxydes des résidus hydroxyproline et des molécules d'eau participent aussi aux liaisons hydrogène, ce qui stabilise la triple hélice. La glycine est essentielle parce qu'elle est petite. En effet, elle apparait périodiquement tous les trois résidus dans la séquence des acides aminés du tropocollagène. La partie interne du câble hélicoïdal à trois brins est très encombrée et seule la glycine peut tenir à l'intérieur. Comme il y a trois résidus par tour d'hélice un résidu sur trois est la glycine. Les deux acides aminés de part et d'autre de la glycine sont situés sur la partie externe du câble, où les volumineux noyaux des résidus prolines et hydroxyproline peuvent aisément prendre place.

Les fibres de collagène présentent des stries perpendiculaires tous les 680 Å tandis que le tropocollagène à une longueur de 3000 Å. Puisque la longueur des fibres est plus

petite que la longueur du tropocollagène, les molécules de deux rangées adjacentes ne peuvent pas être en correspondance. En micrographie électronique, on a pu montrer que les fibres de tropocollagène d'une rangée sont séparées par 400 Å et que des rangées adjacentes sont déplacées de 680 Å. La structure se répète donc toutes les cinq rangées. L'espace de 400 Å entre des molécules de tropocollagène est important car il permet au collagène de former des liaisons croisées après que la fibre se soit formée. Cet espace pourrait aussi jouer un rôle dans la formation de l'os. En effet, nous verrons plus loin que la phase inorganique de l'os ressemble à de l'hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. On rencontre les cristaux initiaux à des intervalles d'envion 680 Å qui correspondent à des périodes de fibres de collagène. Il se pourrait que les espaces entre les molécules de tropocollagène soient les sites de nucléation pour le dépôt du calcium. Le collagène se caractérise donc par le fait qu'il forme des fibres insolubles qui ont une grande résistance à la traction.

2-2-2. LA MATRICE NON COLLAGENIQUE

La substance fondamentale non collagénique est essentiellement composée de *glycoprotéines* et de *protéoglycanes.* Ces complexes fortement anioniques ont une grande capacité à former des liaisons ioniques et l'on pense *qu'ils jouent un rôle* ***important*** *dans le processus de la calcification et de la fixation des cristaux d'hydroxyapatite* sur les fibres de collagène ***(37-38).*** Des *lipides* participent également au procédé de calcification (phosphatidylserine, phosphatidylinositol) ***(39-40-41).***

Des références sont données *à titre d'exemple,* le sujet, étant toujours en cours d'investigation***(42 à 50).***

2-3. LES CELLULES DES TISSUS OSSEUX

Cette partie, et en général tout ce qui concerne la physiologie de l'os s'est largement inspirée des articles de BARON R. (1993)***(1)*** , de CHENU C. et DELMAS P.D. (1994)***(51),*** et de FREEMONT A.J. (1989) ***(52).***

2-3-1. LES OSTEOBLASTES

Pour la plus grande partie, le remaniement du tissu osseux se situe principalement à la surface endostéale (c'est à dire à l'interface avec la moelle osseuse). Cette surface est morphologiquement hétérogène, et cette hétérogénéité reflète les différentes activités cellulaires spécifiques du remodelage.

Les ostéoblastes ***(53)*** sont les cellules de l'os responsables de la production des constituants de la matrice et de la substance fondamentale. Elles proviennent de cellules mesenchymateuses de la moelle ou du tissu conjonctif. Ces précurseurs, avec une bonne stimulation, prolifèrent, se différentient et deviennent des ostéoblastes. Les ostéoblastes n'apparaissent jamais ni ne fonctionnent pas individuellement, mais on les trouve toujours dans des amas de cellules cuboïdales, le long de la surface de l'os (environ 100 à 400 par site de formation osseuse).

Par observation au microscope, l'ostéoblaste est caractérisé par un noyau rond à la base de la cellule (base opposée à la surface de l'os), un important cytoplasme basophile et un complexe de Golgi proéminent logé entre le noyau et l'apex de la cellule. On trouve toujours les ostéoblastes en couche sur la matrice osseuse qu'ils sont en train de produire et qui n'est pas encore calcifiée (tissu ostéoide). La présence de l'ostéoide est due au laps de temps entre la formation de la matrice et sa calcification (la période de maturation de l'ostéoide est de 10 jours environ). Derrière les ostéoblastes se trouvent généralement une ou deux couches de cellules, cellules mésenchymateuses et préostéoblastes.

Au niveau ultrastructure, l'ostéoblaste est caractérisé par d'une part la présence d'une extrémité bien développée, réticulum endoplasmique rugueux avec des cisternae dilatées et un contenu dense et granulaire et d'autre part la présence d'un large complexe de Golgi. Les prolongements cytoplasmiques sur le côté de sÈcrétion de la cellule s'enfoncent profondément dans la matrice ostéoide et sont en contact avec les prolongements d'ostéocyte dans leur canaliculi. On trouve souvent des jonctions lacunaires (gap junctions) entre les ostéoblastes. *La membrane plasmique de l'ostéoblaste est riche en phosphatase alcaline* (la phosphatase alcaline sérique est utilisé comme index de formation de l'os). Elle possède aussi des récepteurs pour l'hormone parathyroidienne, mais pas pour la calcitonine. Les ostéoblastes ont aussi, dans leur noyau, des récepteurs pour les oestrogènes et la vitamine D. En fin de période de sécrétion, les ostéoblastes deviennent soit une cellule bordante aplatie soit un ostéocyte.

2-3-2. LES OSTEOCYTES

La matrice osseuse calcifiée n'est pas métaboliquement inerte, et des cellules *(ostéocytes)* se trouvent emprisonnées profondémment à l'intérieur de l'os dans de petites lacunes (25000/mm^3 d'os). Elles étaient, à l'origine des cellules de formation de l'os *(ostéoblastes)* qui ont été emprisonnées dans leur propre production de matrice osseuse qui, plus tard, s'est calcifiée. Ces cellules ont de nombreux prolongements cellulaires riches en microfilaments qui sont en contact avec ceux d'autres cellules (jonctions lacunaires fréquentes) ou avec d'autres prolongements de cellules de la surface de l'os. Ces prolongements se sont organisés durant la formation de la matrice et avant sa calcification : ils forment un réseau de fins *canaliculi* recouvrant la matrice osseuse entière.

Il y a un espace compris entre la membrane plasmatique de l'ostéocyte et la matrice de l'os elle-même, à la fois dans la lacune et dans les petits canaux, *l'espace périostéocytaire* rempli avec du fluide extracellulaire (ECF : Extra Cellular Fluid).

La morphologie de ces ostéocytes diffère suivant leur âge et leur activité fonctionnelle. Dérivant des ostéoblastes, un jeune ostéocyte conserve la plupart des caractéristiques ultrastructurelles de ces cellules mais le volume est plus petit et l'importance liée à la synthèse des protéines est moindre. Un ostéocyte plus vieux, logé plus profondémment à l'intérieur de l'os calcifié, montrera une accentuation de cette tendance et, en plus, une accumulation de glycogène dans son cytoplasme. Les capacités de synthèse de la matrice extracellulaire induisent une calcification et les capacités de résorption des ostéocytes demeurent des sujets de discussion.

On sait que l'os est capable d'altérer sa structure en réponse au stress. Le réseau complexe de l'ostéocyte pourrait agir comme un capteur de pression différentielle étendu pouvant détecter des variations dans l'os. Ces informations seraient conduites et transmises aux cellules responsables du remodelage de l'os à la surface.*(52)*. Toutefois, il semblerait que les ostéocytes ne soient pas nécessaires dans ce processus *(102)*.

Le sort des ostéocytes est d'être phagocité et digéré en même temps que les autres composés de l'os pendant la résorption de l'os par les ostéoclastes..

2-3-3. LES OSTEOCLASTES

L'ostéoclaste *(54)* est la cellule de l'os responsable de la résorption de l'os. C'est une cellule multinucléée géante (4 à 20 noyaux) généralement au contact de la surface osseuse calcifiée et à l'intérieur d'une lacune *(lacune de Howship)* qui est le résultat de sa propre activité de résorption. Il est possible de trouver jusqu'à 4 ou 5 ostéoclastes sur le même site de résorption mais généralement il ne sont qu' un ou deux par site.

Au microscope, les noyaux apparaissent différents à l'intérieur d'une même cellule : soit ronds et euchromatiques ou aux contours très irréguliers et hétérochromatiques. Ils sont probablement le reflet de fusions asynchrones de précurseurs mononucléaires. Le cytoplasme est "dense" avec beaucoup de vacuoles. La zone de contact avec l'os est caractérisée par la présence d'une bordure plissée et de zones denses de chaque côté appelée zone de scellement ou de fixation.

Les caractères ultrastructuraux caractéristiques de cette cellule sont : l'abondance des complexes de Golgi disposés de manière caractéristique autour de chaque noyau, des mitochondries et des vésicules de transport avec les enzymes lysosomiaux. Le caractère prédominant de l'ostéoclaste est cependant l'existence de replis profonds de la membrane plasmique sur la surface faisant face à la matrice osseuse. Ils forment la bordure plissée qui est surmontée par un anneau de protéines contractiles servant à attacher la cellule à la matrice osseuse et à sceller le compartiment de résorption de l'os subostéoclastique (sealing zone). La fixation de la cellule à la matrice est assurée par des récepteurs aux protéines d'attachement de la matrice, les intégrines. La membrane plasmique dans la surface de la bordure plissée contient des enzymes de types divers dont le rôle est de dégrader la matière organique et de dissoudre les cristaux d'os en abaissant le pH (phosphatases acides).

2-3-4. LES AUTRES CELLULES DU TISSU OSSEUX

Les précurseurs des ostéoblastes peuvent se différencier et proliférer sous l'action de certains facteurs systèmiques ou locaux. La matrice cartilagineuse est sécrétée par les préchondroblastes et les chondroblastes.

3 - LE MECANISME DE RESORPTION DE L'OS

Des enzymes lysosomiaux sont activement synthétisées par les ostéoclastes. On les trouve dans le reticulum endoplasmique, le Golgi et dans beaucoup de vésicules de transport. Ces enzymes lysosomiaux sont sécrétées, à travers la bordure plissée dans le compartiment extracellulaire de résorption de l'os. Ces enzymes atteignent une assez forte concentration extracellulaire du fait du scellement de ce compartiment. Des *récepteurs mannose-6-phosphate* assurent en outre le transport de ces enzymes pour la sécrétion au pôle apical des ostéoclastes. Enfin la cellule sécrète des enzymes non lysosomiaux telle la collagénase. ***(1-54-55)***

Les ostéoclastes acidifient le compartiment extracellulaire en sécrétant des protons à travers la membrane de la bordure plissée (pompe à proton). Une évidence récente suggère la présence d'une pompe à proton électrogénique ATPase. Les protons alimentent la pompe par l'*enzyme anhydrase carbonique* qui est en forte concentration dans le cytosol de la cellule. L'ATP ainsi que le dioxyde de carbone sont pourvus par les mitochondries.

L'activité de la membrane basolatérale est d'échanger du bicarbonate par du chlorure en évitant ainsi l'alcalinisation du cytosol. Les pompes à sodium basolatérales doivent s'impliquer dans un transport secondaire actif de calcium et/ou de protons en association avec un échangeur Na^+, Ca^+ et/ou un antiport Na^+, H^+.

Le compartiment extracellulaire de résorption de l'os est ainsi l'équivalent fonctionnel d'un lysosome secondaire avec un faible pH, des enzymes lysosomiaux et d'un substrat.

Le faible pH dissout les cristaux minéraux en exposant la matrice. Les enzymes, à présent avec un pH optimal, dégradent les composés de la matrice. Les résidus de cette digestion extracellulaire sont soit internalisés soit transportés à travers la cellule (transcytosis) et relargués dans le domaine basolatéral ou rejetés pendant les périodes de relâche de la zone de scellement. (Ces périodes sont probablement induites par un capteur à calcium en réponse à l'augmentation du calcium extracellulaire dans le compartiment de résorption de l'os.)

4 - LES DIFFERENTES TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES D'ETUDES DE L'OS

La connaissance de base des structures des CaPs provient des études par diffraction X et analyse radiale ou par diffraction neutronique. Cependant, pour la plupart des apatites (précipités, biologiques et minérales) cela n'a pas encore été possible par manque de cristaux de référence. Il existe donc actuellement un grand regain d'intérêt dans le développement et l'application de nouvelles méthodes de spectroscopie et de diffraction donnant des informations sur les structures internes et de surface des solides polycristallins. Nous nous bornerons d'indiquer quelques articles ***(56 à 74)*** concernant la diffraction X et la fonction de distribution radiale, la spectrométrie RMN (*Nuclear Magnetic Resonance* NMR), la MAS RMN *(Magic Angle Spinning)* , la spectrométrie EPR *(Electron Paramagnetic Resonance)* l'EXAFS *(Extended X-Ray absorption Fine Structure)* , la spectrométrie Mössbauer. La méthode Rietveld de détermination de structure à partir des diffractogrammes de poudres obtenus par diffraction des rayons X et de diffraction neutronique ***(75-76)*** est également utilisée.

La connaissance physico-chimique des solides fait aussi appel aux techniques telles que la microscopie électronique (EM), la microscopie à balayage (SEM) et toutes les méthodes d'analyse thermique ***(76 à 81)***.

4-1. LA DIFFRACTION DES RAYONS X (DRX)

La diffraction des rayons X est d'un emploi aisé avec des matériaux bien ou assez bien cristallisés comme peuvent l'étre par exemple l'émail des dents. Les paramètres du réseau peuvent être calculés à partir de diffractogrammes des poudres à l'aide des étalons par la méthode des moindres carrés. La méthode Rietveld, déjà citée précédemment, donnerait des résultats plus précis. Actuellement, elle n'est pas généralisée mais pourrait être très attractive dans l'avenir. Néanmoins, pour les os et la dentine, sauf dans le cas ou l'ion F^- est en forte concentration, la diffraction X se heurte à la faible cristallisation des matériaux ce qui influe considérablement sur la précision des résultats. Cependant, des cristallographes ***(82)*** ont abordé et essayé de résoudre ce problème par l'emploi des transformées de Fourier.

Certains auteurs ***(83)*** ont trouvé par DRX dans les métaphyses distales d'un lapin de deux jours, des pics pouvant être attribués à de l'OCP ou du DCPD alors que dans la publication de la ***reference 15*** la DRX n'avait pas mis en évidence le DCPD. Toutefois, dans la même publication ***(15)***, les auteurs faisaient remarquer la possibilité du DCPD comme composé mineur mis en évidence par ^{31}P Mass NNR. Bien que l'OCP et le DCPD soient proposée comme précurseur du minéral de l'os, la mise en évidence d'OCP et de DCPD par DRX reste un sujet à controverses. D'autres études, ***(57)*** sur des poulets n'ont pas mis en évidence la présence d'ACP. La spectrométrie ^{31}P RMN ainsi que des études similaires par DRX, sur des os de poulets embryonnique, montrent que l'ACP ne se trouve pas en grande quantité (maximum 8 à 10% en masse) de même que le DCPD (maximum 1%).

4-2. LA SPECTROMETRIE INFRAROUGE

Nous avons déjà évoqué précédemment que l'utilisation de la spectrométrie infrarouge (souvent associée à la DRX) permet aux minéralogistes l'étude et la caractérisation des différents phosphates de calcium *isolés*. Cette technique est utilisée depuis très longtemps. Actuellement, elle demeure la méthode de choix dans le cas des différentes substitutions des apatites.

L'analyse infrarouge à transformée de Fourier ou FTIR permet des *traitements mathématiques* (déconvolutions, interpolations, dessommations, dérivés....), l'*accès aux méthodes de réflexion* mais surtout , par *sa rapidité et sa facilité de mise en oeuvre* (il n'est pas nécessaire de faire le vide...) *des couplages avec d'autres techniques ainsi que* le contrôle de l'analyse structurale en cours de transformation.

La FTIR a donné un renouveau à la spectromérie infrarouge qui, avec les systèmes dispersifs, était devenue une technique "vieillissante" par rapport à des techniques "plus à la mode" telles la RMN, la RPE, la spectrométrie de masse. Actuellement, la spectrométrie infrarouge *FTIR se place parmi les méthodes analytiques les plus performantes.*

Il nous parait opportun de faire un très bref rappel de l'analyse par infrarouge et de connaitre les limites physiques et instrumentales de cette technique dans le cas particulier d'un matériau hétérogène tel que l'os.

4-2-1. NOTIONS D'ORDRE CRISTALLIN

La perfection cristalline est intimement liée à l'idée d'invariance de la structure sous l'effet de toutes les opérations de symétrie du groupe d'espace.

La perfection de la périodicité cristalline peut être perdue par le désordre positionnel dû à la substitution d'ions étrangers, le désordre dû à l'introduction de défauts ponctuels, le désordre rotationnel, le désordre translationnel ainsi que le désordre dû à des enclaves ou des séparations de phase.

On distingue l'ordre à courte distance et à longue distance. L'ordre sur une longue distance est définie comme la réplication parfaite d'unités durant la translation et concerne principalement la symétrie translationnelle. Dans l'ordre à courte distance ce sont les arrangements et les dérangements qui surviennent à l'intérieur de l'unité élémentaire qui sont pris en compte. Cette distinction est importante car les spectres dans le domaine de l'infrarouge sont fortement influencés par l'ordre à courte distance et relativement insensibles à l'ordre à longue distance. Les spectres RAMAN sont sensibles aux deux, mais le sont plus particulièrement aux changements d'ordre à longue distance : défauts distribués de manière aléatoire, impuretés, solutions solides, cloisonnement de phase ou autre variation de composition pouvant amener une rupture dans la symétrie translationnelle sans que la symétrie rotationnelle (ordre courte distance) soit affectée. C'est une des raisons pour laquelle on parle souvent de la *complémentarité de la spectrométrie RAMAN et IR.*

4-2-2. LA SPECTROMETRIE INFRAROUGE à TRANSFORMEE DE FOURIER (IRTF ou *FTIR*)

4-2-2-1. généralités

Nous ne rentrerons pas dans le détail de la théorie de la spectrométrie d'absorption infrarouge. De nombreux ouvrages y sont consacrés. Nous rappelerons seulement quelques principes *généraux* de ce type d'absorption. (annexe).

Un cristal contenant N atomes constitue un oscillateur mécanique avec 3 N degrés de liberté qui donnent 3 N fréquences de vibrations mode normal. Ces fréquences sont excitées par l'agitation thermique. Sous l'action d'une radiation monochromatique une oscillation dans un cristal peut être forcée. Une telle vibration possède une grande amplitude lorsque la fréquence de la radiation résonne avec une fréquence propre de l'oscillateur.

Une molécule, *pour absorber le rayonnement IR doit avoir une variation de son moment dipolaire.* C'est seulement dans ces circonstances que le champ alternatif de la radiation interagit avec la molécule et cause des changements dans l'amplitude d'un de ses déplacements. Les molécules censées absorber le rayonnement IR doivent donc être polaires.

4-2-2-2 Principe

La spectrométrie IRTF est une spectrométrie multiplex. La lumière incidente est détectée globalement après avoir été codée par un interféromètre qui remplace le monochromateur et après avoir passé à travers l'échantillon.

Le fonctionnement de l'interféromètre est le suivant : Le faisceau incident I_0 est divisé en deux par une séparatrice. Un des faisceaux est envoyé sur un miroir fixe et l'autre sur un miroir mobile perpendiculaire au premier. Les faisceaux sont recombinés sur la séparatrice en créant des interférences qui dépendent de la différence de chemin optique parcouru δ : *le retard.* L'intensité du signal $I(\delta)$ est mesuré en fonction de δ ce qui génère l'interférogramme. La relation entre l'interférogramme et le spectre d'absorption $A_0(\nu)$ est la transformée de Fourier.

$$\boxed{A_0(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta)\cos(2\pi\bar{\nu}\delta)d\delta}$$

$\bar{\nu}$ est le nombre d'onde en cm^{-1}

L'application pratique nécessite l'utilisation d'un ordinateur utilisant un algorithme similaire au Fast Fourier Transform (FFT) développé par COOLEY ET TUKEY en 1965 et appliqué à la spectrométrie par FORMAN en 1966. Cet algorithme permet d'avoir des données hautes résolutions sur tout l'intervalle du spectre infrarouge.

Pratiquement il est impossible de faire varier δ entre $-\infty$ et $+\infty$. L'interférogramme est tronqué à $\pm$ L. L est le parcours maximal du miroir mobile. On

compensera cette coupure en convoluant la transformée de Fourier avec une fonction de troncature appelé fonction d'apodisation FAp.

$$A(\bar{\nu}) = A_0(\bar{\nu}) * TF(F_{ap})$$

$\bar{\nu}$ est le nombre d'onde en cm^{-1}

La forme analytique de la fonction d'apodisation définit la fonction instrumentale du spectromètre c'est à dire la forme de la bande d'absorption.

Ω_{max} est l'angle solide maximum
Il dépend de la résolution et de l'intervalle spectral.

$$\Omega_{max} = 2\Pi(\Delta\bar{\nu}/\bar{\nu}_{max})$$

$\Delta\bar{\nu}$ est la résolution en cm^{-1}

L'angle solide est contrôlé par une ouverture qui a le même effet que la fente d'entrée d'un monochromateur. Dans la plupart des spectrophotomètres la source est imagée à la sortie de l'ouverture, à la focale dans le compartiment échantillon et au détecteur.

En FTIR, on définit la bande passante par la longueur maximale de balayage ce qui permet d'atteindre de hautes résolutions.

Les principaux avantages de la spectrométrie à transformée de Fourier par rapport au système dispersif sont :

→ un rapport signal/bruit de fond amélioré (comme la racine carrée du nombre d'éléments spectraux mesurés),

→ un flux lumineux traversant le spectromètre important lié à la suppression du monochromateur. Les nombres d'onde peuvent donc être mesurés avec plus de précision ce qui permet l'accumulation de spectres.

→ la possibilité d'utiliser des accessoires multiples et divers (photoacoustique, réflexion diffuse, réflexion spéculaire, microscopie...).

→ la possibilité, du fait d'obtenir un spectre très rapidement, d'opérer des couplages avec d'autres techniques analytiques de séparation (chromatographiques) ou autres (thermiques) pour mesurer des phénomènes rapides.

→ la possibilité de traiter les spectres mathématiquement (déconvolution, interpolation, dérivés, filtrage, lissage...) permet d'atteindre des fréquences plus précises, de diminuer la largeur des bandes d'absorption, ou de s'affranchir de réflexions internes gênantes générées par certains échantillons (ex: les franges d'interférences dans les films plastiques).

Il faut aussi noter que l'informatique, avec ses nombreuses possibilités : de soustraction et d'addition de spectres, de décompositions de bandes complexes par des fonctions gaussiennes et/ou lorentziennes, de grossissement, de recherches automatiques dans des bibliothèques de spectres, de mise en page, ont rendu cette technique beaucoup plus conviviale.

Les inconvénients de la FTIR sont principalement liés à l'acquisition du "blanc" et de l'échantillon en deux temps. En effet, le blanc prend inévitablement en compte l'atmosphère

qui règne dans le spectromètre. En conséquence, il peut y avoir une différence dûe à la non-reproductibilité de cette atmosphère lors de l'acquisition de l'échantillon puisqu'il aura fallu nécessairement le positionner. Cette atmosphère, surtout liée à la présence de dioxyde de carbone et de vapeur d'eau peut être *très gênante* lorsque ces bandes se superposent à d'autres bandes intéressantes du matériau (ce qui est le cas pour la matière organique de l'os). Pour travailler dans ces zones, il faudra être vigilant notamment au balayage en air sec de l'appareillage et opérer une purge soignée avant toute acquisition (blanc et échantillon). Mais souvent la bande de dioxyde de carbone vers 2320 cm^{-1} est bien connue et ne gêne pas beaucoup à cet endroit et pour les mesures courantes ce n'est pas un véritable problème.

4-2-2-3. La réflexion diffuse

L'accessoire de réflexion diffuse associé à la spectrométrie IRTF, s'il est utilisé avec quelques précautions, permet de donner des informations autres que celles d'un spectre acquis en mode de transmission où l'échantillon est "noyé" dans une pastille de bromure de potassium (analyse de charbons, etc...) **(figure 2)**.

Sous l'effet d'un rayonnement, La lumière incidente est partiellement réfléchie par les particules en surface, à l'interface gaz/solide. Une autre partie pénètre dans l'échantillon (de manière variable mais d'environ 2 à 3 fois la longueur d'onde) avant d'être réfléchie à son tour et renvoyée sur le détecteur. A condition que l'échantillon soit suffisamment épais pour qu'aucune lumière ne le traverse et si l'on fait la mesure par rapport à une surface de référence, la grandeur déterminée est la réémission R'~.

La théorie phénoménologique de KUBELKA-MUNK ***(114-115-116)*** a été établie à partir de l'équation de transfert de radiation pour un milieu isotrope. C'est une méthode dite continue. Le milieu est considéré comme un milieu homogène délimité par deux plans parallèles, caractérisé optiquement par son coefficient de diffusion S et son cefficient d'absorption K.

A température ambiante les problèmes liés à l'émission induite par la température peuvent être négligés. L'étude de l'influence de noir de carbone dans la peinture blanche a permis à Kubelka d'établir la formule bien connue des spectroscopistes :

$$\boxed{f(R_\infty) = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} = \frac{K}{S}}$$

Le modèle de Kubelka-Munk comporte deux paramètres : K représente le coefficient d'extinction, S le coefficient de diffusion. R_∞ est la réflectance de l'échantillon semi-infini. Cette condition est définie afin d'imposer un flux de lumière nul traversant le milieu. Dans la pratique, une épaisseur de quelques millimètres suffit pour satisfaire cette condition . La grandeur mesurée par l'instrument correspond à la réflectance de l'échantillon. Néanmoins, la spectrométrie infrarouge étant une méthode différentielle, un composé de référence doit être choisi. La réflectance mesurée devient relative à ce composé, et se définit comme le rapport des réflectances absolues suivant :

$$R_\infty = \frac{R_{\infty\ \acute{e}\ chantillon}}{R_{\infty\ reference}}$$

L'intérêt principal étant l'absorption sélective de la lumière par l'échantillon, la référence est choisie parmi les diffuseurs non absorbants dans la région spectrale désirée. La mise en équation des processus complexes impliqués dans la diffusion impose quelques hypothèses simplificatirices. Pour aboutir à la forme simple de la fonction de Kubelka-Munk, il faut supposer :

- une distribution isotrope du faisceau diffusé
- l'absence de réflexion spéculaire
- des particules distribuées de petite taille
- un coefficient de diffusion indépendant de la longueur d'onde.

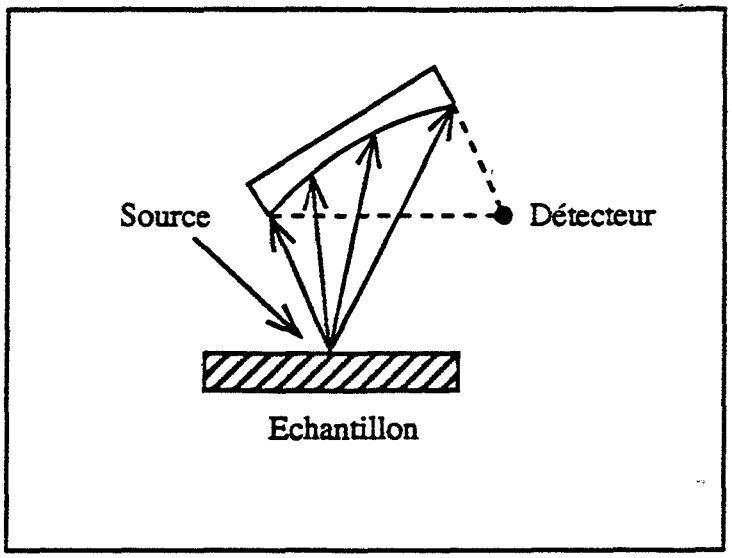
Il existe différents montages optiques et différents systèmes de réflexion diffuse qui ont pour but principal déviter toute réflexion spéculaire des échantillons. Si cette réflexion est importante, elle se signale par un brusque décrochement ou un signal «type dérivé» et une discontinuité dans les spectres.

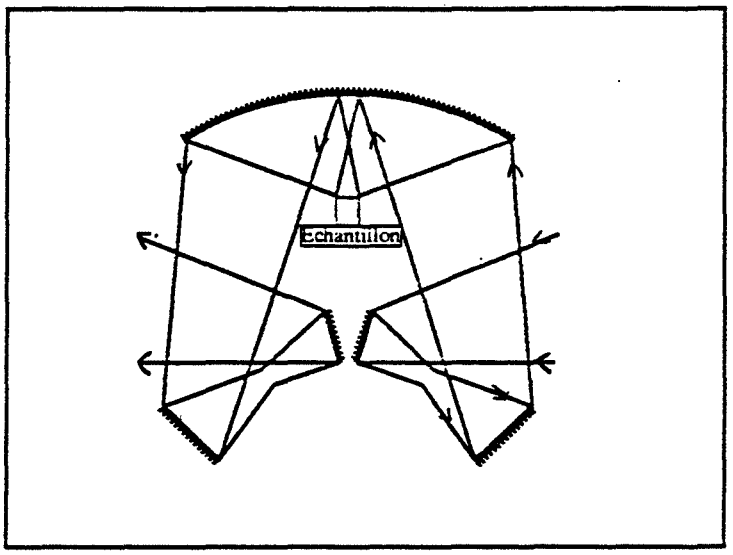
4-2-2-4 La FTIR-microscopie

Cette technique procure des informations qualitatives de la structure chimique de petits spécimens ou d'échantillons hétérogènes (10-15 µm). Elle fait partie des méthodes micro-analytiques comme la microsonde Raman, la micro-ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis), l'AES (Auger Electron Spectroscopy), l'EPMA (Electron Probe microanalysis) et le SIMS (Secondary ion mass spectrometry). La microsonde Raman, bien qu'elle possède une plus grande résolution spatiale que la microscopie infrarouge, souffre souvent de problèmes dûs à la fluorescence ou à la décomposition thermique de l'échantillon par la condensation de son faisceau laser. La FTIR-microscopie possède un champ d'application plus vaste que la microsonde Raman. Elles sont toutefois complémentaires dans leurs rËgles de sélection.

L'observation des petites aires permet de clarifier la composition de matériaux tels que : petites inclusions, impuretés, contaminants, microstructure, ainsi que la composition de matériaux biologiques (calculs, tissus, section). *Le fait que les mesures puissent être faites à l'atmosphère ambiante constitue un des avantages majeurs de la FTIR-microscopie.* De plus, la cartographie (mapping) du matériau et sa représentation, permettant de mettre en évidence son hétérogénéité, sont possibles grâce à des logiciels appropriés.

La FTIR-microscopie est une des méthodes d'avenir dans la recherche des structures des matériaux hétérogènes. On peut déjà trouver des publications concernant le domaine médical et particulièrement le tissu osseux ***(94 à 100)***.





ACCESSOIRE DE REFLEXION DIFFUSE

figure 2

5. L'ANALYSE DU TISSU OSSEUX PAR IRTF

5-1. LE MINERAL

La spectrométrie infrarouge est utilisé depuis longtemps dans la recherche structurale des minéraux comme les phosphates de calcium. De très nombreuses écrits y font référence parmi lesquels l'ouvrage de synthèse de FARMER ***(84)***. D'autres auteurs publièrent dans ce domaine minéral (ROSS, NAKAMOTO...). Cependant, certaines valeurs trouvées dans la littérature souffrent de leur "ancienneté" car les spectres ont été acquis avec des spectromètres dispersifs qui n'étaient pas aussi performants que la FTIR.

Nous donnerons ici quelques références concernant la FTIR ***(18-19 et 85 à 93)*** mais il nous parait préférable de donner les résultats bibliographiques ainsi que les assignations de bandes en même temps que nos résultats. En effet, une nomenclature de longueurs d'onde pourrait très vite devenir fastidieuse si elle n'est pas associée à une visualisation de spectres.

Certaines études récentes réalisées par FTIR ***(18-19)*** dans la partie minérale des matériaux biologiques ont utilisé des traitements mathématiques (déconvolutions). D'autres auteurs ont utilisé la FTIR-microscopie pour aborder la caractérisation du minéral osseux ***(94 à 100)***. Des analyses d'os en poudre ont été faites par réflexion diffuse surtout dans le domaine archéologique ***(101)***.

5-2. LA MATIERE ORGANIQUE

La matière organique (collagénique et non-collagénique), à notre connaissance, n'a pas beaucoup été étudiée par FTIR sur le matériau brut de l'os mais toujours après des extractions. Toutefois, il faut noter les travaux de SAUER et de WUTHIER ***(93)*** dans le domaine de formation des os *in vitro* (à patir de solutions) et l'identification des diverses phases par FTIR. Les mêmes auteurs avec ZUNIC et DURIG ont en 1994 ***(117)*** abordé le problème de la minéralisation avec la spectroscopie Raman à Transformée de Fourier. La spectroscopie Raman n'était pas jusqu'à maintenant très utilisée dans le domaine de la biologie à cause des problèmes de fluorescence. La FT- RAMAN utilise des sources moins énergétiques et, de ce fait, permet de travailler avec les matériaux biologiques.

5-3. LES PROBLEMES ANALYTIQUES

Plusieurs difficultés existent dans l'étude des tissus osseux. Les os sont souvent différents suivant les espèces considérées (poulet, lapin, rat, homme...) et, pour une même espèce, d'un individu à l'autre. Pour le même individu, la composition sera différente suivant la localisation ou le type d'os (os longs, illiaque...) mais aussi dans les différentes zones spatiales du même os. Il y a souvent des changements durant la formation et la maturation (remodelage : « *turnover*») des os. De plus, on a montré que suivant l'âge ou les maladies, la composition pouvait varier. On aborde souvent l'os comme un matériau

homogène alors qu'il s'agit d'un matériau hétérogène organisé. Il est aussi présumé que des changements de structure *in vivo* peuvent avoir lieu pour tout traitement chimique (ingestion de médicament ou autre..) ou physique (effet de l'immobilité, de la microgravité...). En somme, toute variation dans la sollicitation du squelette pourrait devenir la cause d'un changement concernant la partie minérale et/ou la partie organique (qui ne sont pas indépendantes). De plus, *à notre connaissance*, aucune méthode d'analyse structurale n'a été faite *in vivo* sur les os.

Enfin, il faut aussi prendre en compte les altérations de l'échantillon pouvant intervenir avant même son analyse : prélèvement pas toujours effectué d'une manière reproductible, conservation et vieillissement du prélèvements pas toujours pris en compte, traitements physiques ou chimiques de *"l'échantillon"* afin de *"le mettre en conformité"* avec la technique d'analyse utilisée (*broyage, pastillage, homogénéisation, mélange* à d'autres produits chimiques non inertes, *extraction* chimique pour enlever la matière organique ou la matière minérale pour faciliter l'identification, etc...).

Un autre problème lié (mais non pas exclusif) à la technique de la spectrométrie IR sur les matériaux complexes tels les os, est dû à l'additivité des fréquences de vibration. On a inévitablement des phénomènes d'intéractions malheureusement non connues. De plus, on se trouve souvent dans l'impossibilité d'étudier certains domaines de longueurs d'onde communs à plusieurs vibrations de groupes différents appartenant à des constituants différents. Dans les os, un exemple est donné par les bandes carbonates dans la région de leurs plus fortes vibrations (1400-1500 cm^{-1}). Ces bandes se trouvent d'une part dans la région commune des bandes de la matière organique de l'os et d'autre part dans "l'empreinte digitale du spectre" ou des combinaisons de bandes ou des harmoniques peuvent avoir lieu. L'observation dans cette zone sera donc un sujet à polémique et l'on préfèrera s'intéresser, dans ce cas, à d'autres fréquences pour l'identification.

Certains de ces aspects ont été simplement et purement négligés jusqu'ici. Il est bien sûr évident que la maitrise et le contrôle de tous ces paramètres sont sûrement très difficiles à réaliser puisque ce ne sont pas les mêmes manipulateurs qui effectuent toutes les opérations, du fait même de leur spécificité et qualification (médecins, biologistes, physiciens ou chimistes...). Il paraît évident que, vu la complexité, seul un travail pluridisciplinaire, à l'avenir, pourra peut être résoudre certains problèmes.

L'objectif de cette recherche est d'essayer d'obtenir le plus *d'informations possibles avec la technique*, principalement la spectrométrie infrarouge, en essayant de toujours garder à l'esprit que c'est la technique qui est au service de l'échantillon mais non pas l'inverse. Il vaut mieux avoir quelquefois des aberrations instrumentales que l'on essayera de contrôler au maximum que des transformations ou des homogénéisations suspectes (par des "préparations" quelconques) qui ne rendraient plus compte de "l'hétérogénéité organisée" du matériau. Néammoins, pour ces aspects instrumentaux, nous avons toujours essayé d'être le plus rigoureux et vigilants possible. Nous avons toujours recherché le maximum de conformité avec les marges d'utilisation de la technique (focalisaton, taille des grains, grand nombre de passages *(scans)* pour assurer une précision maximum dans l'acquisition des spectres avant de *pouvoir* les traiter mathématiquement).

CONCLUSIONS

En résumé :

Le tissu osseux est constitué de phosphate de calcium dont la plus grande partie est une hydroxyapatite non stoechiométrique déposée, d'une manière organisée, dans une matrice organique où le collagène, une protéine fibreuse, est prédominant. En d'autres termes, le nombre de molécules de collagène est sensiblement égal au nombre de molécules des autres constituants organiques mais la molécule de collagène est de très grande taille.

La dimension et la perfection (cristallinité) des cristaux de l'apatite différent suivant le site mais aussi suivant l'âge de l'individu.

Des changements dans la compositon de la phase minérale et dans la perfection cristalline peuvent intervenir dans le processus de calcification biologique, normal ou pathologique.

La caractérisation du minéral osseux est importante pour la connaissance des mécanismes fondamentaux mais aussi dans un but thérapeutique lorqu'il y aura anomalie dans la déposition du minéral et/ou dans le remaniement *("turnover")(118 à 127)*.

La cristallinité des tissus minéralisés et des minéraux synthétiques analogues a été largement étudiée par diverses méthodes chimiques et instrumentales. La plupart de ces études portaient sur des poudres homogènes (ou homogénéisées) à des fins analytiques. Cependant, des questions ne peuvent pas être réglées lorqu'il s'agit de poudres homogènes.

Des études récentes abordent le problème différemment en faisant appel notamment au traitement mathématique en analyse FTIR ***(18-19-90-91)***, mais aussi à des techniques nouvelles comme par exemple la microscopie associée à la spectrométrie infrarouge ***(94 à 100)***.

chapitre 2

II - MATERIELS ET METHODES

1 - LES MATERIAUX ECHANTILLONNES

1-1. LE MATERIEL HUMAIN

1-1-1. PROVENANCE

Il est indispensable d'étudier des os ne présentant pas d'anomalie avant de pouvoir porter un jugement sur le tissu osseux en général. La médecine légale nous a permis d'avoir des échantillons de 27 sujets décédés de mort violente, sans pathologie connue.

Notre premier objectif a été de normaliser le plus possible cette étude. La justesse du résultat est conditionnée, en grande partie, non par l'instrumentation mais par le prélèvement et le traitement de l'échantillon avant l'analyse. Il faut, en outre, afin d'établir des comparaisons veiller à ce que toutes ces opérations soient "normalisées".

1-1-2. PRELEVEMENT ET CONDITIONNEMENT

Le prélèvement est effectué à l'aide d'un trocart Bordier dans l'os iliaque. Il se présente donc sous une forme de carotte de forme cylindrique de 5 à 7 mm de diamètre, la base étant l'os cortical et les parois latérales l'os trabéculaire.

Dès que le prélèvement est effectué, l'échantillon "est fixé" avec de l'alcool éthylique absolu de manière à pouvoir analyser à la fois la matière minérale et organique ainsi qu'une partie de la matrice extracellulaire. L'alcool préserve les éléments minéraux qui sont insolubles dans l'alcool et fixe le glycogène.

1-1-3. CONDITIONS D'ANALYSE

L'analyse par spectrométrie infrarouge a été réalisée le plus rapidement possible après le prélèvement. Malheureusement, pour des raisons pratiques, nous n'avons pas pu normaliser ce paramètre. Toutefois l'analyse n'a pas excédé un maximum de 6 jours, après le conditionnement.

Un essai de vieillissement du matériau hors de l'alcool a été effectué pour quelques échantillons. L'acquisition des spectres au bout de 50 jours a été effectuée. Le facteur *"temps réel après la mort"* n'a pas été pris en considération.

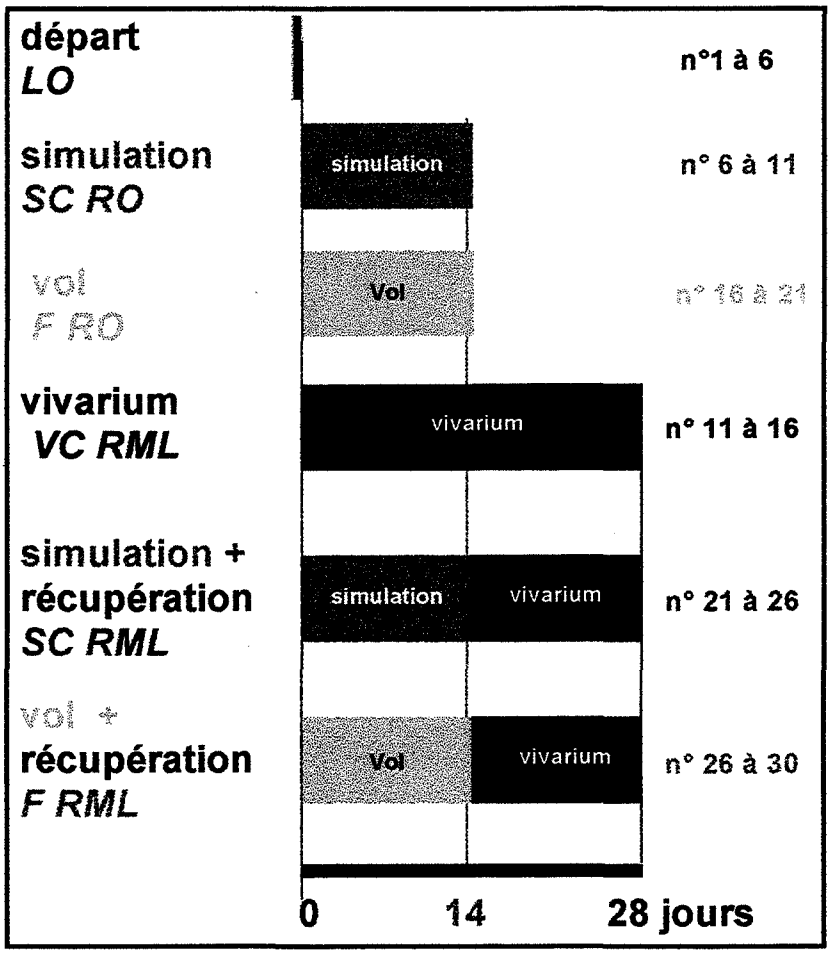
Des déminéralisations, effectuées sur l'os trabéculaire de la crête iliaque d'hommes âgés respectivement de 29, 36 et 49 ans, ont permis d'une part d'avoir un étalon de collagène de type I et d'autre part d'observer les "zones" imputables à la matière organique et à la matière minérale. Trois sortes de déminéralisations différentes ont été réalisées : avec de l'acide trichloracétique, de l'EDTA, et de l'acide trichloracétique + du formol (1/2). Le suivi de la déminéralisation s'est fait en analysant les échantillons par spectrométrie infrarouge à 39 et 70 jours.

1-2. LE MATERIEL ANIMAL

1-2-1. EXPERIMENTATION EN MICROGRAVITE

L'effet de la microgravité sur le tissu osseux a pu être analysé grâce à la mission STS-58, SPACELAB-2, de la NASA.

Les essais portaient sur trente rats mâles, issus de rats Sprague-Dawley, de *Taconic Farms* (USA) âgés 38 jours (date de naissance : 23 août 1993). *Ces rats étaient en période de croissance*. Des groupes de rats, pris au hasard, furent constitués.



La série LO :	rats sacrifiés au temps zéro (lancement de la fusée)
La série SCRO :	rats sacrifiés au bout de 14 jours (ayant subi une simulation de vol)
La série FRO :	rats sacrifiés au bout de 14 jours (ayant participé au vol spatial)
La série VCRML :	rats sacrifiés au bout de 28 jours (issus du vivarium)
La série SCRML :	rats sacrifiés au bout de 28 jours (14 jours de simulation et 14 jours de vivarium)
La série FRML :	rats sacrifiés au bout de 28 jours (14 jours de vol spatial et 14 jours de vivarium)

Le groupe VC RO ne nous est jamais parvenu. C'était un groupe important puisque les rats n'avaient pas été soumis à l'effet de la microgravité et avaient exactement l'âge de ceux qui revenaient de la mission.

1-2-2. PRELEVEMENT ET CONDITIONNEMENT

Les fémurs furent disséqués puis mis dans de l'alcool éthylique absolu. Avant l'analyse ils furent exposés à l'air ambiant du laboratoire pour sécher. La surface fut alors examinée, sans broyage, afin de préserver les liaisons chimiques dans la phase minérale, dans la phase organique et aussi entre la phase minérale et la phase organique.

L'échantillonnage de tous les os de rat a été réalisé dans *la même région spatiale* (métaphyses).

1-3. MISE EN FORME DES ECHANTILLONS

Les parties de l'os cortical et de l'os trabéculaire furent analysées séparément.

- En spectrométrie infrarouge, les échantillons n'ont subi aucun broyage.

- En couplage thermogravimétrie-spectrométrie IR, l"échantillon d'os trabéculaire, de constitution fine et "poudreuse", a été analysé tel quel. La failble quantité de matière disponible et la morphologie du fémur du rat (2 à 3 mg seulement), ont été un problème pour l'examen. Nous n'avons jamais pu doubler nos manipulations sur le même fémur.

L'os cortical plus dense (une quinzaine de mg) n'a pas subi de broyage pour éviter toute altération. Il a seulement été grossièrement fragmenté pour entrer dans la coupelle de mesure.

Toutefois, sur une manipulation, pour mettre en évidence les effets de compacité du matériau dans l'analyse thermogravimétrique nous avons abrasé un échantillon.

- En couplage thermogravimétrie-spectrométrie de masse les échantillons n'ont subi aucun broyage.

- En diffraction RX, les échantillons d'os trabéculaire des rats n'ont pas subi de broyage. La friabilité de l'os trabéculaire a permis l'étalement sur la plaque porte échantillon. Pour les motifs cités plus haut, l'os cortical n'a pas été observé en diffraction RX.

- En couplage spectrométrie infrarouge-microscopie, l'échantillon *d'os humain* n'a subi aucun broyage. l'analyse a été faite en réflexion.

2 - INSTRUMENTATION ET METHODES

2-1. LA SPECTROMETRIE INFRAROUGE IRTF

2-1-1. LE MATERIEL

Nous avons utilisé :

- Un spectromètre DIGILAB FTS40 avec un détecteur DTGS muni d'un accessoire à réflexion diffuse (modèle Harrick) de DIGILAB partiellement modifié pour obtenir la focalisation du rayonnement sur les échantillons **(figure 2)**.

- Un spectromètre DIGILAB FTS60 avec un détecteur MCT muni d'un accessoire de microscopie UMA 500 pouvant travailler en absorption et en réflexion.

Tous les traitements mathématiques pour les déconvolutions de spectres ont été effectués avec le logiciel du spectromètre DIGILAB FTS 40 mais la dessommation des bandes (curve fitting), ainsi que la présentation des résultats sont réalisés à l'aide du logiciel GRAMS de GALACTIC INSTRUMENTS.

2-1-2. LA METHODE

2-1-2-1. L'acquisition des spectres

Nous avons essayé d'intervenir le moins possible sur la préparation des échantillons pour éviter de perturber le tissu osseux et sa matrice par des phénomènes liés soit au broyage (écrasements voire même dans certains cas modifications de phase) *(129)* soit à des "mélangeages" avec du bromure de potassium quit est très hydrophile. L'étuvage de la pastille est à proscrire dans notre cas.

L'acquisition des spectres IR des échantillons osseux est effectuée, en réflexion diffuse, sur des morceaux d'os massifs, en prenant soin de focaliser le faisceau lumineux d'une manière analogue à celle prévue pour l'acquisition avec des poudres. On a utilisé un petit accessoire de positionnement adaptable à chaque forme d'échantillon.

En réflexion diffuse, on privilégie la surface par rapport au volume mais on obtient d'autres informations que ne permettrait pas une homogénéisation du matériau.Il est admis que l'épaisseur de pénétration est de 2 à 3 fois la longueur utilisée (les longueurs d'onde utilisées sont de 2,5 µm à 25 µm).La conversion transmission (réflexion)-Kubelka-Munk donne en général des bandes plus intenses (dans certains domaines) mais aussi plus étroites que celles observées avec des acquisitions par transmission classique. C'est un avantage, dans notre cas non négligeable et la bande par exemple à 960 cm^{-1} (ν_1 des phosphates) qui n'est jamais bien résolue en transmission classique (épaulement) est toujours apparue en réflexion diffuse bien définie.

L'émail des dents présente une partie organique faible par rapport aux autres tissus calcifiés et de ce fait a été très étudié avec les techniques physico-chimiques puisque la faible teneur en matière organique rend plus facile l'interprétation (en diffraction RX ou en spectrométrie IR). Toutefois, il faut souligner que les cristaux des tissus osseux sont bien plus petits que ceux de l'émail donc *l'état de surface du tissu osseux devient un paramètre important.*

Afin de minimiser le plus possible les erreurs inhérentes aux conditions d'acquisition en réflexion diffuse, il a fallu s'assurer, d'après la théorie de M. KUBELKA et MUNK, que la taille des cristaux osseux soit inférieure à la longueur d'onde du rayonnement infra-rouge utilisé c'est à dire inférieure à 2,5 µm. Cette étude a éré réalisée au moyen d'un microscope électronique à balayage JEOL JSM840. En moyenne, les grains présentent une taille voisine du µm (photographie en annexe).

Toutes les acquisitions sont faites de 4000 à 400 cm^{-1} (2,5 à 25 µm) mais le domaine de longueur d'onde utilisé dans notre observation s'étend de 2000 à 400 cm^{-1} (5 à 25 µm) ce qui est bien supérieur à la taille des particules observées. De plus, la distribution du faisceau diffusé est isotropique. Dans ces conditions l'utilisation de l'accessoire de réflexion diffuse devient possible en minimisant les erreurs optiques. Toutefois, il faut souligner que dans certains spectres nous avons eu de la réflexion spéculaire parasite (réflexion obéissant à la loi de DESCARTES) notamment vers les faibles nombres d'onde. Chaque fois cela a été souligné. La réflexion spéculaire s'observe par une fracture (discontinuité genre dérivé) du spectre et *il faut veiller à ne pas considérer cette aberration comme une bande.*

Une étude préalable a été réalisée afin de déterminer les conditons optimales en réflexion diffuse.

- Etude avec des blancs différents allant de la "matité" du bromure de potassium étuvé à la réflectivité du papier aluminium.
- Etude avec des résolutions et des scans différents (2, 4 et 8 cm^{-1} ; 16, 64 , 128, 256 scans)
- Etude de répétabilité instrumentale : acquisition du même spectre plusieurs fois de suite sans déplacer l'échantillon.
- Etude de la représentativité de l'échantillon : acquisition de plusieurs spectres sur le même os mais en modifiant la position.

Après plusieurs essais, les divers paramètres choisis sont les suivants : une résolution de 4 cm^{-1} et 256 passages (scans) dont la valeur est nettement suffisante pour tous les échantillons. *Une bonne reproductibilité dans l'acquisition AVANT tout traitement*

mathématique, par exemple les déconvolutions, est primordiale. Le bromure de potassium *étuvé* et broyé sert à l'acquisition du "blanc".

Lors de la mise au point de la technique instrumentale, chaque mesure a été répétée trois fois sur le même échantillon afin de s'assurer d'une bonne répétabilité dûe à la fois aux caractéristiques instrumentales et à l'homogénéité de l'échantillon. Aucune différence significative n'est apparue.

2-1-2-2. L'observation et le traitement des spectres

Les spectres sont d'abord observés dans la gamme spectrale de l'acquisition (4000-400 cm^{-1}) sans aucun traitement mathématique. Des grossisements dans l'intervalle 1200-900 cm^{-1} pour les bandes des phosphates et autres, 900-800 cm^{-1} pour les bandes carbonates et phosphates. Nous avons observé aussi la région des vibrations de déformation hors du plan et dans le plan ("out of plane et in the plane") dans le domaine 800 - 400 cm^{-1} pour conforter quelques attributions. "L'empreinte digitale" du spectre se situant vers 1400 cm^{-1} a été examinée avec prudence. En effet, outre les combinaisons de bandes susceptibles d'être présentes dans cette zone, des bandes minérales (carbonates) se juxtaposent aux bandes organiques (déformation (bending) des liaisons C-H etc...). Quelques remarques sur le détail des bandes OH vers 3600-3500 cm^{-1} ont été signalées.

Les spectres d'acquisition permettent d'observer les principaux domaines d'absorption par exemple le domaine 1200-900 cm^{-1} pour les bandes phosphates. Si nous désirons observer dans ce domaine un mélange de plusieurs phosphates il faut alors opérer avec des traitements mathématiques tels les déconvolutions qui permettent de "rétrécir" les bandes d'absorption et dans ce cas "d'extraire" par exemple d'un épaulement une bande mieux définie ***(128)***.

Pour choisir les paramètres de déconvolution, une certaine prudence et le respect de certaines règles sont à observer :

- Ne pas mettre une largeur (paramètre HW) inférieure à celle de l'acquisition
- Ne pas avoir des bandes dont les bords franchiraient la ligne de base du zéro (ordonnées négatives). Le spectre se présenterait alors en dents de scie et il faudrait reconsidérer les paramètres.

La vigilance à l'égard de ces traitements mathématiques est importante car suivant la largeur (paramètre HW) demandée pour effectuer la déconvolution on aura plus ou moins de bandes vraies ou fausses...Le spectre brut de l'acquisition doit être observé pour déterminer les épaulements ou renflements des bandes de manière à orienter la déconvolution en choisissant les paramètres adéquats pour avoir uniquement ces bandes.

Plusieurs choix de paramètres sont possibles avec le logiciel de traitement mathématique de la station DIGILAB 3200. Après quelques tâtonnements pour avoir une déconvolution acceptable nous avons choisi les paramètres suivants :

BESSEL ; F = 2 , HW = 20 ou 10 suivant les cas.

Les paramètres choisis ont été gardés constants pour tous les échantillons, pour un intervalle de longueur d'onde donné. Quelquefois, sur certains spectres une bande n'est pas déconvoluée correctement avec ces paramètres mais le fait est rare.

Nous avons aussi essayé un léger lissage ainsi qu'un traitement d'interpolation (ceci permet de corriger l'erreur fréquente de "pic brisé" à son sommet, en "l'arrondissant") ce qui joue sur la précision du nombre d'onde.

Lorsque tous ces traitements spécifiques ont été effectués nous avons transféré de la station UNIX 3200 nos données sur PC 486 (système DOS). La dessomation ("curve fitting") a été effectué à l'aide de GRAMS de GALACTIC. *Seules les bandes apparaissant avec la déconvolution ont été prises en compte.* Les paramètres de dessomation ont été choisi dans cette optique.

2-2. L'ANALYSE THERMIQUE COUPLEE A L' IRTF

2-2-1. LE MATERIEL

2-2-1-1 l'analyse thermique

L'analyseur thermique DSC 111 de SETARAM permet, outre des mesures d'enthalpie (DSC ou ACD en français : analyse calorimétrique différentielle), des analyses thermogravimétriques. Seule l'analyse par thermogravimétrie à été prise en compte dans ce couplage. La température maximum est de 800 °C. Le gaz de balayage est l'argon. Les nacelles sont en platine de quelques millimètres de diamètre sur une dizaine de mm de haut. Des chemises en quartz sont installées pour protéger le four et les thermocouples. A la sortie du four une ligne de transfert chauffée est reliée à la cellule à gaz de l'accessoire TGA-IR.

La vitesse de 20 $°C.mn^{-1}$ de montée en température est choisie comme un *compromis* entre la précision de l'analyse thermique, la sensibilité de détection de l'analyse des gaz par infrarouge et les problèmes inhérents à la technique. En effet, lorsque nous sommes en couplage avec la spectrométrie infrarouge, le gaz sortant de l'analyseur thermique balaie en permanence la cellule de gaz du spectromètre IR. Nous avons choisi un paramètre d'acquisition pour obtenir un spectre par seconde (environ). Dans ces conditons, l'espace mémoire de la station Unix 3200, n'autorisait pas un temps supérieur à 'une quarantaine de minutes.

En conclusion, l'analyse thermique est effectuée sous balayage d'argon avec une montée de température de l'ambiante à 800 °C (vitesse de 20 $°C.mn^{-1}$).

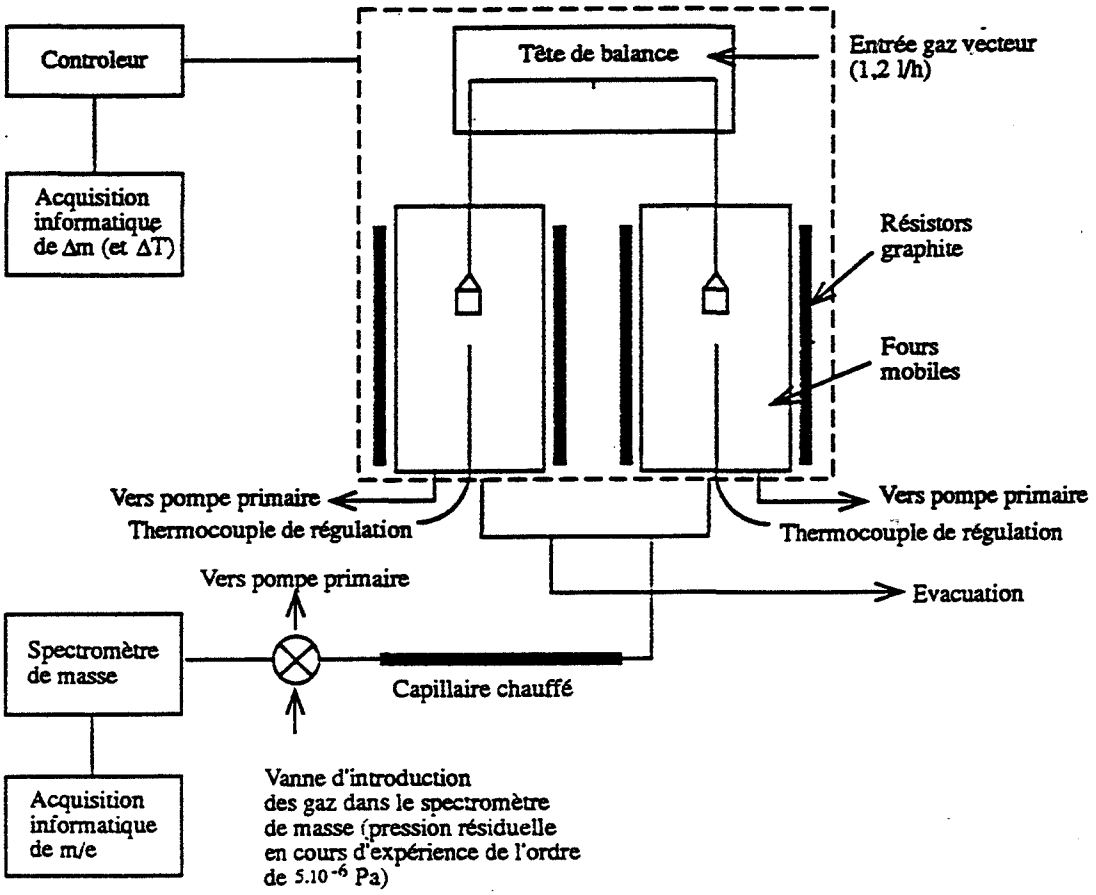
2-2-1-2. la spectrométrie infrarouge - compartiment gaz -

La spectrométrie infrarouge IRTF dont l'un des avantages est la rapidité d'acquisition (moins d'une seconde pour balayer tout le spectre...) est devenue une méthode de choix pour des couplages avec des techniques qui nécessitent des suivis rapides quand à l'identification des espèces. L'analyse chromatographique est *souvent* couplée avec l'analyse IRTF. En effet il est intéressant d'associer une technique *de séparation* à une technique *d'identification,* le couplage bénéficiant aux deux techniques. Actuellement le couplage analyse thermique et analyse par spectrométrie IRTF est plus rare. Il n'en est pas pour autant moins intéressant.

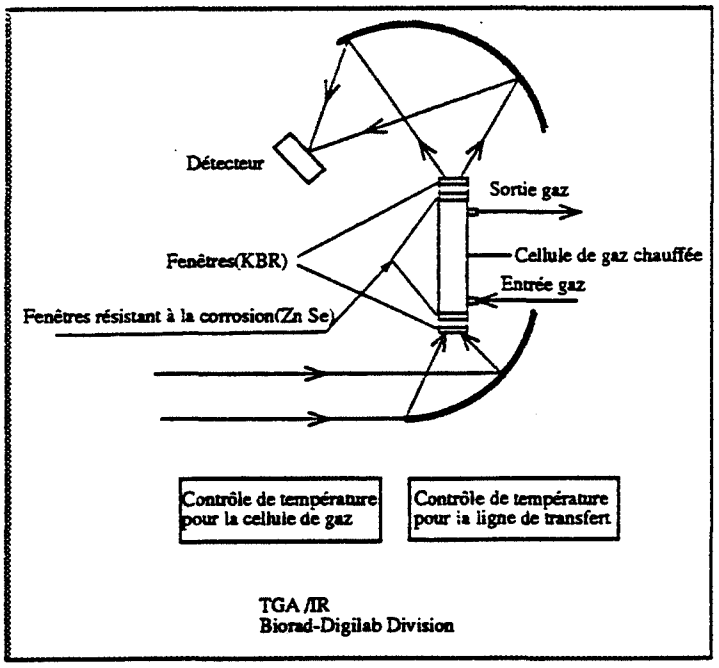
L'analyse thermogravimétrique nous donne comme indication la perte de masse de l'échantillon en fonction du temps (ou de la température) mais pas l'identification des gaz rejetés lors de cette perte. L'expérience a montré que lors du chauffage la plupart des échantillons émettaient des gaz relativement simples tels la vapeur d'eau, l'ammoniac et les différents oxydes de carbone, soufre ou azote. Même dans le cas où ils sont rejetés simultanément, l'identification est relativement aisée puisqu'ils ont des fréquences d'absorption caractéristiques ainsi que des contours (formes) de bandes caractéristiques. Des produits plus complexes ne sont pas toujours identifiables mais la classe des composés (avec des liaisons C-H ou autres) donnent souvent une bonne information sur la nature des produits.

Le spectromètre utilisé est le FTS 40 de BIORAD (DIGILAB) équipé **(figure 3)** d'un compartiment, comprenant une cellule à gaz chauffée et d'une ligne de transfert chauffée permettant le couplage avec l'analyse thermique (TGA-FTIR). En outre ce compartiment comprend des contrôleurs de température, un système optique de focalisation ainsi qu'un détecteur DTGS. Lors de l'acquisition d'un spectre infrarouge avec un FTS 40 équipé du compartiment cellule de gaz, on peut envoyer le faisceau soit dans le compartiment échantillon classique (interne) soit dans la cellule de gaz, que l'on vient de décrire (externe).

La cuve de gaz est le modèle TGC de chez HARRICK SCIENTIFIC (10 centimètres de long et 6 mm de diamètre interne). Elle possède un double fenêtrage à chaque extrémité dont l'intérêt a été prouvé. Les fenêtres de séléniure de zinc sont utilisées pour prévenir des dommages notamment avec la vapeur d'eau chaude. Les fenêtres de bromure de potassium agissent comme écran de chaleur pour éviter des condensations sur les fenêtres de séléniure de zinc (intéressant pour les produits volatils semi-lourds dans l'analyse des charbons par exemple).



COUPLAGE ANALYSE THERMIQUE- SPECTROMETRIE DE MASSE



COUPLAGE ANALYSE THERMIQUE - SPECTROMETRIE INFRAROUGE
compartiment cellule de gaz du spectromètre infrarouge FTS 40 de BIORAD

figure 3

2-2-2. LE COUPLAGE TGA-FTIR

Les paramètres de l'expérience sont les suivants :
ATG vitesse de montée : 20° C.mn^{-1} sous argon (de 20 à 800 °C)
FTIR 4 passages (scans) - résolution de 8 cm^{-1}.

Lors de l'acquistion des interférogrammes, simultanément l'intégration de tout ce que"voit le détecteur" est enregistré en fonction du temps, calculé suivant la méthode Gram-Schmidt **(103)**. Cet enregistrement porte le nom de *"Chromatogram"* et ressemble très souvent à la courbe dérivée en ATG de l'échantillon. Il permet grâce aux points singuliers de ces "pics" ou "bandes" de déterminer parmi la multitude d'interférogrammes enregistrés lors du couplage de choisir les temps (donc les températures) où des émissions de gaz sont susceptibles d'être présents. Ce *chromatogram*, bien que ne représentant pas un phénomène physique à proprement parlé, est très utile pour déterminer le nombre de spectres que l'on gardera définitivement ainsi que "l'allure" de ces divers départs.

Lors de la prochaine acquisition la mémoire se videra de tous les interférogrammes et seuls resteront les spectres (ou interférogrammes) choisis à l'aide du *chromatogram*.

Les différents *chromatogrames* peuvent aussi être une très bonne indication de la reproductibilité des manipulations (mêmes produits, même intégration des départs de gaz).

2-3. LA MICROSCOPIE COUPLEE A L'IRTF

Un microscope UMA 500 est couplé avec un spectromètre IRTF BIORAD FTS 60 (DIGILAB). Le détecteur utilisé est un détecteur MCT. Le microscope UMA 500 peut travailler en transmission et en réflexion. Un système permet d'isoler un domaine étroit dans la surface de l'échantillon ce qui permet d'observer l'hétérogénéité de l'échantillon.

2-4. LES TECHNIQUES ANNEXES

2-4-1. LA DIFFRACTION X

L'appareil utilisé est un diffractomètre "SIEMENS D5000". Les échantillons d'os trabéculaire (très friables) ont été simplement étalés sans broyage sur la plaque porte échantillon.

2-4-2. LE COUPLAGE ANALYSE THERMOGRAVIMETRIQUE - SPECTROMETRIE DE MASSE (figure 3)

La thermobalance SETARAM est du type "TAG24" et le spectromètre de masse quadripolaire BALZERS de type "QMG 111A" La thermobalance est équipée de deux fours symétriques et d'une pompe primaire permettant d'atteindre un vide résiduel de 1 Pa environ. Une canne (ATD) spéciale permet d'effectuer une analyse thermique différentielle simultanément à l'analyse thermogravimétrique. Nous avons travaillé uniquement en thermogravimétrie. Nous avons gardé les mêmes creusets en platine que pour le couplage avec la FTIR et la même vitesse de balayage (20 °C mn^{-1}). Le gaz de balayage est amené de la thermobalance (pression atmosphérique) vers le spectromètre de masse (pression de l'ordre de 10^{-8} Pa) grâce à un capillaire chauffé afin d'éviter les problèmes de condensation. Une vanne spéciale d'introduction permet de conserver la composition du mélange gazeux, sans discrimination.

Les masses de m/e = 1 à m/e = 100 peuvent être analysées. Avant de commencer une expérience il suffit seulement d'indiquer les masses à considérer et la durée d'acquisition pour chacune d'elles.

Le protocole expérimental est le suivant :

→ Mise en place de l'échantillon

→ Balayage d'hélium C (gaz vecteur) pendant 45 mn sous fort débit (environ 30$l.h^{-1}$afin de purger la thermobalance.

→ Balayage d'hélium C pendant 10 mn sous faible débit de 1,2 $l.h^{-1}$ environ qui est le débit de l'expérience.

→ Montée en température de la balance à 20°C.mn-1 de l'ambiante à 800°C avec acquisition de la perte de masse.

→ Simultanément analyse par spectrométrie de masse.

Les résultats de l'analyse par spectrométrie de masse sont exprimés par le temps en fonction de la quantité de gaz émis (en unités arbitraires). A l'aide du couplage il a été facile de relier le temps et la température puisque l'analyse thermique nous permet de connaitre, à chaque instant, le temps, la température et la perte de masse. La température en fonction d'unité arbitraire a été tracée pour chaque courbe de départ de gaz.

chapitre 3

III - RESULTATS

1 - LES REFERENCES

1-1. PROVENANCE DES MATERIAUX

Différents phosphates de calcium susceptibles de se trouver dans le tissu osseux ont été étudiés en spectrométrie infrarouge, suivant le mode de réflexion diffuse (DRIFT). Les matériaux de référence se présentent sous forme de poudre. Le bromure de potassium, étuvé à 110° C, qui n'absorbe pas le rayonnement infrarouge est utilisée comme substance de référence lors de l'acquisition des spectres (« *background* »).

Une partie des échantillons provient des laboratoires MERCK ou CARLO ERBA et une autre partie a été élaborée suivant le protocole utilisé par J.C ARVIEU *(36)*.
Les modes d'obtention de ces différents phosphates sont les suivants :

1) DCPD ou brushite, $CaHPO_4$, $2H_2O$:
On prépare :
- 2 litres de di-hydogéno phosphate de potassium, KH_2PO_4 à 0.1 M : *solution 1*,
- 2 litres de chlorure de calcium 0.1 M : *solution 2*.

On verse *la solution 1* dans *la solution 2* en maintenant le pH à 5 par de l'acide chlorhydrique et en agitant.

2) OCP ou phosphate octacalcium, $Ca_8\ H_2\ (PO_4)_6$, $5H_2O$:
- 3.44 g de DCPD préparé comme ci-dessus + 0.667 g de carbonate de calcium ($CaCO_3$) précipité. On maintient en suspension dans 500 ml d'eau (flacon non bouché) pendant 48 heures à 30°C. Vérification par diffraction X.

3) Carbonate de calcium, CaCO3
Préparation par double décomposition entre deux solutions molaires de chlorure de calcium (CaCl2) et de carbonate de potassium (K2CO3).

4) Hydroxyapatite : $Ca_{10}\ (PO_4)_6\ (OH)_2$:
- 6/25 mole (31.7 g) de hydrogénophosphate d' ammonium, $(NH_4)_2\ H\ PO_4$ est dissoute dans 1 litre d'eau bouillie puis la solution est amenée à pH 12 avec de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH): *solution 1*.
- 2/5 mole de nitrate de calcium ($Ca\ (NO_3)_2$) est dissoute dans 500 ml et la solution est amenée à pH 12 par NH_4OH : *solution 2*.
- On verse la solution 1 dans la solution 2 goutte à goutte en maintenant le pH à 12 et à l'abri de l'air (atmosphère d'azote) puis on met à l'ébullition, à reflux, pendant 1 heure.

1-2. LES SPECTRES INFRAROUGES DES PHOSPHATES DE CALCIUM -

généralités -

Le spectre d'absorption infrarouge d'un ion complexe dans un cristal diffère du spectre théorique de l'ion "libre". La fréquence exacte observée pour un motif en vibration peut être altérée par les contraintes stériques et par les effets dynamiques des oscillateurs voisins identiques.

L'effet de symétrie de site peut donner des modes dégénérés dédoublés dans un réseau cristallin. De même des mouvements corrélés des groupes phosphates dans le réseau primitif peuvent donner des dédoublements des modes dégénérés ou non dégénérés *(factor group splitting)*. Une symétrie de site est en général suffisante pour prédire le nombre de modes vus dans des échantillons en poudre. Des différences entre les fréquences observées en IR et RAMAN s'expliquent par les effets de multiplicité *(factor group splitting)* ***(104-105).***

L'ion PO_4^{3-} a la symétrie tétraédrique (Td). Il possède 3N - 6 degrés de liberté interne, répartis en quatre modes normaux de vibration, A1, E et 2F2. En l'absence de perturbations environnantes, les deux modes de vibration triplement dégénérés (2F2), actifs en infrarouge sont situés dans la région 1000-1200 cm^{-1} pour les vibrations de valences *(stretching)* P-O et dans la région 500-580cm^{-1} pour les vibrations de déformations *(bending)* O-P-O. La vibration de valence P-O totalement symétrique (A1), active en Raman est située à 936 cm^{-1} et les vibrations de déformations doublement dégénérées (E) se trouvent dans la région 350-420 cm^{-1} **(tableau 1*)*.**

La protonation du groupe phosphate réduit la symétrie à C_{3v} en donnant huit modes vibrationnels. La vibration de valence P-O ν_2, dont la fréquence est augmentée et se trouve vers 988 cm^{-1} et la vibration de déformation doublement dégénérée O-P-O, ν_8, dont la fréquence est diminuée et se trouve à 394 cm^{-1} au lieu de 420 cm^{-1}. La vibration de valence P-O triplement dégénérée est dédoublée en un mode doublement dégénéré ν_6 vers 1076 cm^{-1} et une vibration de valence P-O-H, ν_3, à 862 cm^{-1}. La fréquence 537 cm^{-1} est attribuée à la fois au dédoublement de la vibration ν_4 P-O en des modes de déformation *(bending)* doublement dégénérés ν_7 et non dégénéré ν_4. La protonation introduit ν_1 (stretching) à 2900 cm^{-1} et ν_5 (bending) doublement dégénérée P-OH vers 1230 cm^{-1}.***(85)***. **(tableau 1*)*.**

L'acquisition de différents phosphates de calcium s'est effectuée avec le spectromètre FTS 40 de BIORAD avec une résolution de 8 cm^{-1} et 32 scans puis contrôlés ultérieurement avec le FTS 185 de BIORAD avec une résolution de 2 cm^{-1} et 32 scans. La dernière acquisition est plus détaillée mais nous avons conservé, afin d'établir des comparaisons avec la littérature, l'acquisition avec la résolutions à 8 cm^{-1}.

TABLEAU RECAPITULATIF des modes de vibration de PO_4^{3-} et HPO_4^{2-} (129-85)

PO_4^{3-} (T_d)			HPO_4^{2-} (C_{3v})		
P-O stretching	ν_1A1	**936 cm^{-1}**	*P-O stretching*	ν_2A	**988 cm^{-1}**
O-P-O bending	ν_2E	**420 cm^{-1}**	*O-P-O bending*	ν_8E	**394 cm^{-1}**
			P-O (H) stretching	ν_3A	**862 cm^{-1}**
P-O stretching	ν_3F2	**1004 cm^{-1}**	*P-O stretching*	ν_6E	**1076 cm^{-1}**
			O-P-O bending	ν_4A	**537 cm^{-1}**
O-P-O bending	ν_4F2	**573 cm^{-1}**			
			O-P-O bending	ν_7E	**537 cm^{-1}**
			(P-)O-H stretching	ν_1A	**2900 cm^{-1}**
			P-O-H bending	ν_5E	**1230 cm^{-1}**

TABLEAU 1

1-3. L'HYDROXYAPATITE - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$- *(106)*

La plupart des apatites cristallisent dans le système hexagonal (groupe d'espace $P6_3/m$). De nombreuses substitutions telles les substitutions ioniques monovalentes (OH-, F-, Cl-) ou bivalentes (CO_3^{2-}, O_2^{2-}, O^{2-}) sont favorisées par les "tunnels" qui traversent le réseau parallèlement à l'axe C.

La symétrie du cristal est liée à la position des ions OH^- localisés dans des tunnels, le long de l'axe C de la structure hexagonale. Les atomes d'oxygène de ces ions hydroxyles sont situés à environ 0,3 Å des plans définis par les triangles Ca, mais la direction des groupements OH par rapport au plan miroir n'est pas clairement définie. La perte du plan réflecteur abaisserait la symétrie du cristal (groupe d'espace C^6_6 - $P6_3$ et le groupe facteur serait alors C_6 *(107)*.

L'analyse respective des groupes C6h et C6 donne 9 et 18 vibrations fondamentales actives en infrarouge pour l'ion phosphate dans l'hydroxyapatite, le nombre de composantes prévues théoriquement tient compte des effets de couplage dynamique entre les six groupements PO_4^{3-}.

L'acquisition de spectre de 4000-400 cm^{-1} présente parfois des artéfacts en-dessous de 450 cm^{-1}. Pour l'identification de l'hydroxyapatite dans le tissu osseux, seules les principales absorptions ont été prises en compte.

Une bonne corrélation est observée pour l'hydroxyapatite entre les échantillons préparés au laboratoire et ceux des fabricants. Cependant, des bandes supplémentaires s'observent très bien en réflexion diffuse qui ne sont pas des artéfacts. Ces bandes peuvent être explicitées *(109)*.

Dans les phosphates cristallins on observe les bandes de l'eau. L'eau (symétrie C_{2v}) présente trois modes internes : les deux vibrations de valence, ν_1 symétrique et ν_3 antisymétrique, ainsi que la vibration de déformation ν_2. Ces fréquences se situent dans la région 3570-2500 cm^{-1} pour ν_1 et ν_3 (suivant le nombre de liaisons hydrogène elles se déplacent et "s'étalent" vers les nombres d'ondes plus faibles) et vers 1640 cm^{-1} pour ν_2. Dans le cas des tissus osseux, les bandes amides se situent également dans cette zone.

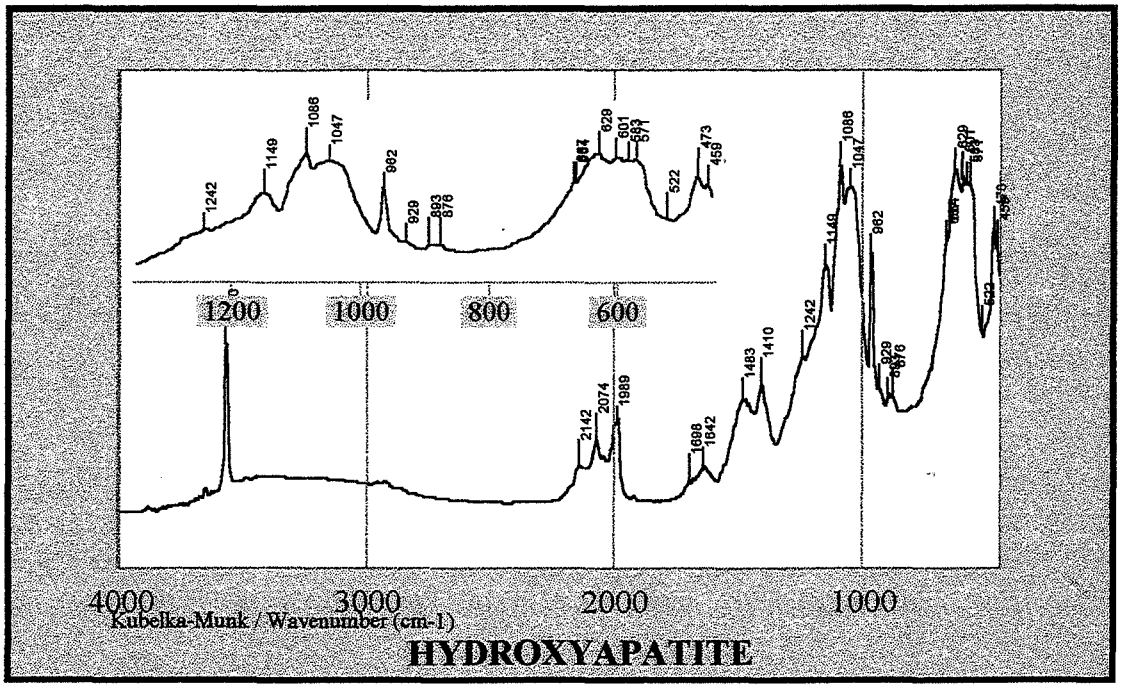


figure 4

FOWLER B.O ***(106)*** ***ABSORPTION (IR)*** *Nombre d'onde* (cm-1)	**figure 4** ***REFLEXION (IR)*** *Nombre d'onde* (cm-1)	*ASSIGNEMENTS*
3572	3570	OH stretching (valence)
1087 1075 sh 1046 1032 sh	1086 1047	ν_3 PO_4
962	962	ν_1 PO_4
630	629	OH *(libration)* balancement
601 571	601 571	ν_4 PO_4
474 462 (sh)	473 459	ν_2 PO_4

sh : épaulement (shoulder)

TABLEAU 2

Le massif situé vers 2000 cm^{-1} (2142, 2074,1989 cm^{-1}) serait dû, d'après plusieurs auteurs (DUYCKAERTS, KLEE, FOWLER ...) à des combinaisons de bandes ou des harmoniques des modes PO_4. On observe que ces massifs prennent une grande importance et sont très bien définis avec l'acquisition en réflexion diffuse. Nous avons même remarqué des altérations de ces bandes sur des os humains présentant des affections mais leur l'interprétation est difficile. Ce massif est peu important en mode transmission du fait de la dilution de l'échantillon dans le KBr.

Les bandes 1500-1400 cm^{-1} seraient des carbonates de surface.

La bande vers 875 cm^{-1} correspond aux carbonates mais aussi, vraisemblablement, aux groupements HPO_4^{2-}. On note également la présence d'une bande vers 1240 cm^{-1} (ν_5 HPO_4^{2-}?). La bande vers 1140 cm^{-1} n'est pas attribuée mais elle est présente dans l'épaulement de forte absorption de la bande de l'octacalcium phosphate de nos échantillons. Nous pouvons aussi observer sur la figure 4 des traces d'hydrocarbures (vibrations de valence symétriques et antisymétriques de CH_3 et CH_2 dans la région de 2980-2800 cm-1) qui proviennent, comme cela arrive souvent, d'une pollution lors de la préparation.

Nous rappelons que la réflexion diffuse donne une importance significative aux surfaces. Or, certains auteurs ont montré l'importance de l'adsorption des ions en surface ***(15-108-109)***. Il existe deux ions phosphates par cellule unité de surface. La fraction des ions phosphates de surface est voisine de A/1200 où A est la surface spécifique en $m^2\ g^{-1}$. Ainsi des ions PO_4^{3-} se trouvent sur la surface et peuvent être protonés ou remplacés par d'autres ions sans aucune restriction imposée par la stoechiométrie du réseau (malgré quelques pertes d'ions Ca^{2+} afin de maintenir la neutralité de charges). Des auteurs ont abordé ce problème ***(109)*** et ont démontré qu'une OHAp précipitée à 70°C, avec une surface BET de 37±1 $m^2\ g^{-1}$ avait 2 % de phosphate sous forme d'ions HPO_4^{2-} Leur commentaire indiquait que la plupart de ces ions sont adsorbés sur les surfaces cristallines ce qui signifie que la majorité des ions de surface sont protonés. La réflexion diffuse peut facilement mettre en évidence ces groupes contrairement à la transmission qui manque de sensibilité puisqu'elle favorise le volume.

1-4. L'OCTACALCIUM PHOSPHATE - $Ca_8\ (HPO_4)_2\ (PO_4)_4,\ 5H_2O$-

Depuis 1957 des auteurs tels BROWN et al. avaient remarqué que le phosphate octacalcique se trouvait en association avec l'hydroxyapatite. Ce produit est généralement préparé par hydrolyse de la brushite. FOWLER et al.***(110)*** interprétèrent en 1966 son spectre infrarouge mais avec beaucoup d'incertitudes. En 1993, FOWLER, MARKOVIC et BROWN interprétèrent à nouveau les spectres infrarouge et Raman du phosphate octacalcique***(111)*** .

Pour ces auteurs, des bandes spécifiques de deux groupes phosphates indépendants sont mises en évidence. Les spectres IR indiquent que deux polymorphes OCP(A) et OCP(B) peuvent exister. Les différences principales entre les deux formes au-dessus de 2000

cm^{-1} sont les positions de bandes et les intensités relatives et au-dessous de 2000 cm^{-1}, dans les positions des bandes correspondantes (différences jusqu'à 14 cm^{-1}). On observe la forme A dans le spectre IR de l'OCP déposé dans ou sur différentes matrices (KBr sec ou film de polyéthyléne), mais la forme B de la même préparation de l'OCP s'observe seulement sur des pastilles de KBr humidifiées ou dans le nujol (huile) ou fluorolube (huile dont les liaisons C-H sont remplacées par des liaisons C-F) ou entre deux fenêtres en KBr.

Ces auteurs ont démontré que la conversion dans les pastilles de KBr entre les formes A et B est possible par exposition dans une atmosphère sèche ou humide ce qui montre que le taux d'humidité est un facteur important de détermination de la structure. Les auteurs suggérent que les structures des polymorphes diffèrent dans l'arrangement de leurs liaisons hydrogènes.

La mise en évidence de ces différences dépend donc du mode de préparation de l'échantillon pour l'acquisition.

Il nous a paru intéressant de comparer le spectre infrarouge du phosphate octacalcique, obtenu *avec l'accessoire de réflexion diffuse* c'est à dire sans aucune préparation, **(figure 5)** avec les spectres obtenus par FOWLER B.O, MARKOVIC M et BROWN W.E. *en transmission classique et avec différentes préparations..*

Le but de l'acquisition en réflexion diffuse n'est pas de mettre en évidence les formes A ou B de l'OCP mais d'établir une bonne concordance des résultats donnés par deux modes d'acquisitions différents dans les principes physiques. Le résultat confirme la fiabilité de l'acquisiton en réflexion diffuse.

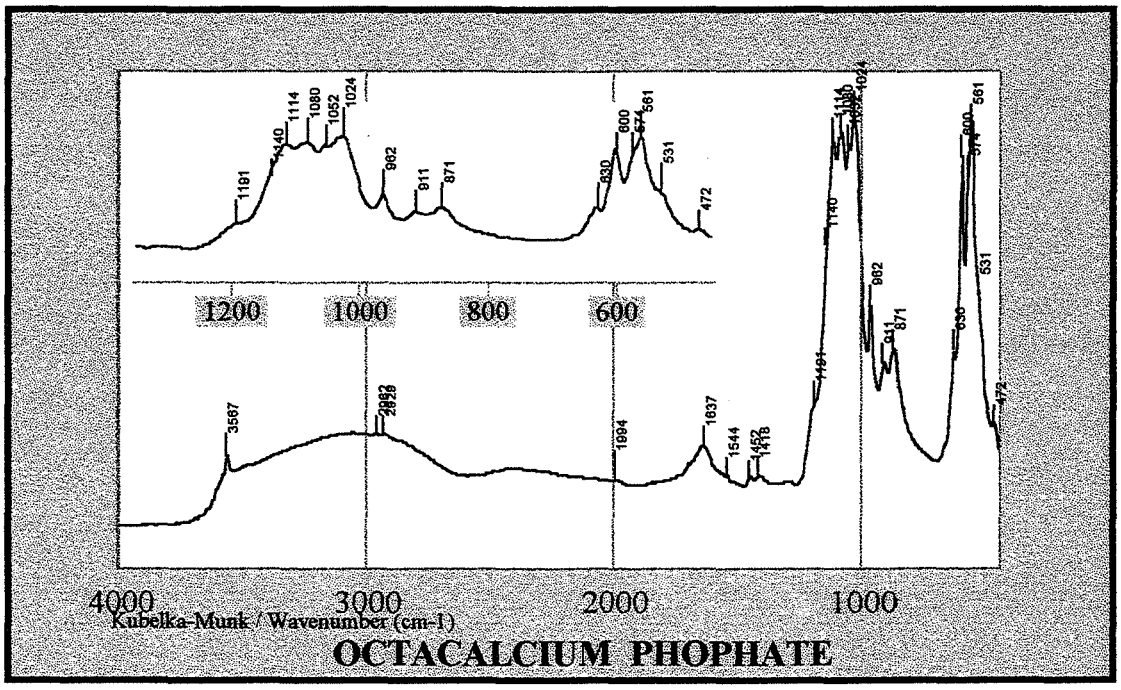


figure 5

FOWLER et al.*(111)* *ABSORPTION (IR)* entre 3 et 5 cm^{-1} Nombre d'onde (cm^{-1}) forme A	forme B	figure 5 *REFLEXION (IR)* 8 cm^{-1} Nombre d'onde (cm^{-1})	*ASSIGNEMENTS*
1207 w	1193 w	1191 sh	HPO_4 OH (in plane)
1138 vw sh	1137 vw, sh	1140 sh	ν_3 HPO_4 (stretching)
1118 s	1121 s	1114 s	ν_3 HPO_4 (stretching)
1109 s	1108 s		ν_3 HPO_4 (stretching)
1093 s		1090 sh	ν_3 HPO_4 .ν_3 PO_4 (streching)
1086 s	1077 s	1080 s	ν_3 HPO_4 .ν_3 PO_4 (streching)
1056 s	1055 s	1052 s	ν_3 PO_4 (stretching)
1038 s	1037 s	1037 sh	ν_3 PO_4 (stretching)
1023 s	1023 s	1024 s	ν_3 PO_4 (stretching)
967 w			ν_1 PO_4 (stretching)
963 w	962 w	962 m	ν_1 PO_4 (stretching)
913 w	917 w	911 w	HPO_4 (P-(OH)) (streching)
873 w	861 w	871 w	HPO_4 (P-(OH)) (streching)
650 vw			H_2O (libration)
627 vw	627 vw	630 m sh	H_2O (libration)
608 vvw, sh			ν_4 PO_4 (bending)
599 m	601 m	600 m	ν_4 PO_4 (bending)
578 w	575 w	574 sh	ν_4 PO_4 .ν_4 HPO_4 (bending)
561 m	560 m	561 s	ν_4 PO_4 (bending)
529 w	524 w	531 m sh	ν_4 HPO_4 (bending)
465 w	466 w	472 w	ν_2 PO_4 (bending)

s = forte (strong) ; m = moyenne (medium) ; v = très (very) ; sh = épaulement (shoulder) ; w = faible (weak)

TABLEAU 3

Comme pour le spectre de l'hydroxyapatite, il existe une bande de l'eau, ν_2 à 1637 cm^{-1} relativement importante car l'OCP contient 5 molécules d'eau par mole. Les carbonates de surface et/ou ceux dûs au mode de préparation sont présents à 1500-1400 cm^{-1} ainsi que les traces de matières organiques (liaisons de valence C-H). On obtient aussi un massif vers 2000 cm^{-1} avec un maximum à 1994 cm^{-1} attribué, comme pour l'hydroxyapatite, à des combinaisons de bandes ou des harmoniques ***(110)***.

Il est vraisemblable que le massif étalé vers 2500 cm^{-1} soit de l'eau adsorbée. En effet, on trouve souvent ces adsorptions de surface dans cette région et la réflexion diffuse les met très facilement en évidence.

1-5. L'HYDROGENE PHOSPHATE DE CALCIUM DIHYDRATE - Brushite - Ca HPO_4, $2H_2O$- *(85)*

CASCIANI et CONDRATE ***(113)*** ont présenté une interprétation détaillée du spectre Raman et ont réactualisé leur travail dans le domaine infrarouge.

Afin d'expliquer les attributions de bande du spectre de la brushite **(figure 6)** nous nous sommes inspirés des commentaires de R.T. BAILEY et de C. HOLT ***(85)***.

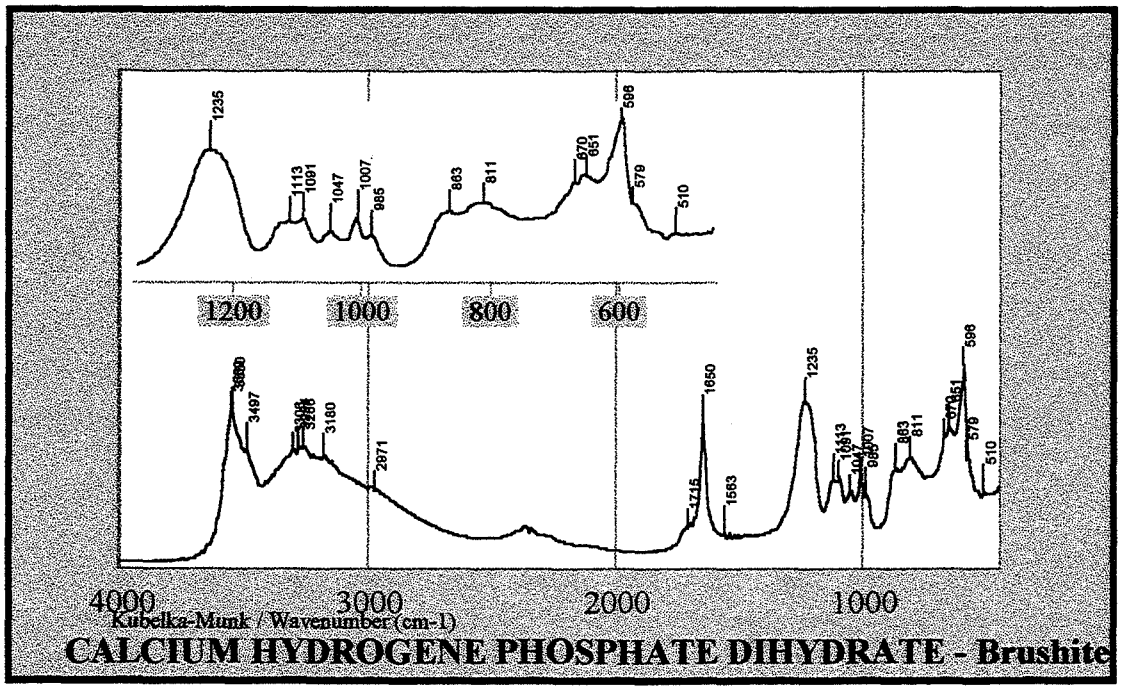


figure 6

Ce spectre présente de nombreuses absorptions dans la région des bandes OH (3500 cm^{-1}). La bande ν_2 de l'eau à 1650 cm^{-1} est très intense et présente un pic à 1715 cm^{-1}. La liaison totalement symétrique des phosphates, ν_2, se présente comme un doublet *(factor group splitting)* avec le principal composant de symétrie A' à 985 cm^{-1} et une résonance plus intense à 1007 cm^{-1} de symétrie A" (dans le spectre de BAILEY ET HOLT les intensités sont inversées). Dans la région de vibration de valence de P-O on observe une bande bien définie à 1047 cm^{-1} et une autre bande à 1091 cm^{-1} avec un épaulement à 1113 cm^{-1}. La vibration P-O-H (bending) ν_5 est très intense et se trouve à 1235 cm^{-1}. Vraisemblablement cette bande est composite et englobe le mode de déformation de P-OH dans le plan (in plane bending). Une bande très importante et fine est située à 596 cm^{-1} avec un épaulement Elle pourrait être dûe aux vibrations de O-P-O bending (ν_4 et ν_7). La vibration P-O(H) stretching (ν_3) n'est pas déplacée et se trouve à 863 cm^{-1}. Les bandes à 651 et 670 cm^{-1} seraient les "balancements" des deux molécules de l'eau ***(112)*** .

1-6. L'HYDROGENOPHOSPHATE DE CALCIUM - Monétite - Ca HPO4- *(85)*

Le spectre de la monétite **(figure 7)** est complexe et difficile à interpréter. Des modes de vibrations couplées entrainent des dédoublements *(factor group splitting)*. L'échantillon provenant de chez ALDRICH ref 23475-3 a été vérifié par un diffractogramme RX. La littérature récente (spectres acquis en FTIR) ne donne pas des assignations de bandes très précises . Toutefois les bandes des modes de vibration dans le plan P-OH sont situées, d'après BAILEY et HOLT, dans la zone 1410-1356 cm^{-1}. On retrouve bien la forte bande composite à 1237 cm^{-1} de la déformation P-O-H (ν_5) avec un épaulement à 1196 cm^{-1}

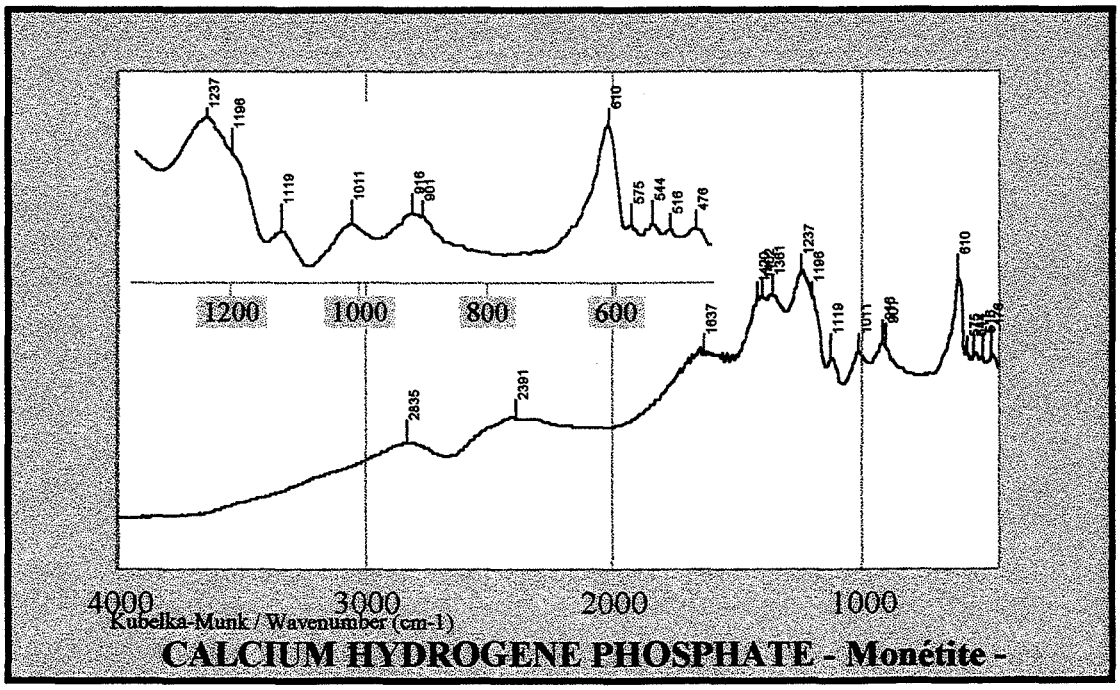


figure 7

1-7. LES AUTRES PHOSPHATES

On trouvera en annexe le spectre du phosphate tricalcique tracé dans les mêmes conditions que les spectres précédents. Les autres phosphates de calcium minéraux ne présentaient pas beaucoup d'intérêt dans le cadre de notre étude.

1-8. LE CARBONATE DE CALCIUM (calcite)

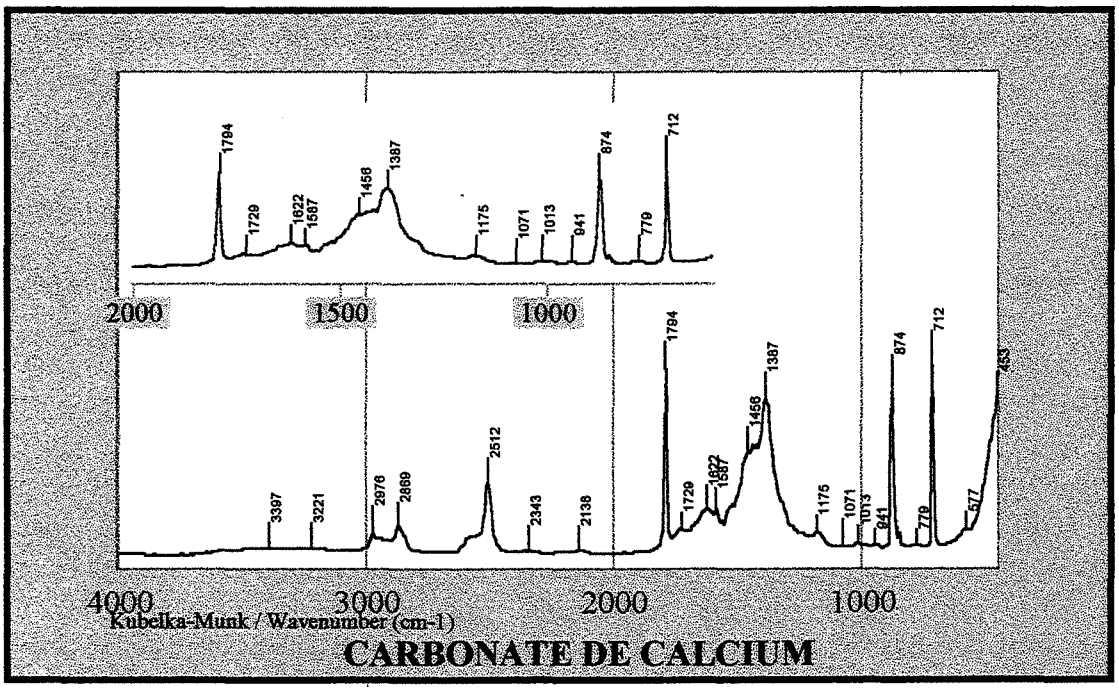


figure 8

L'ion carbonate présente un spectre infrarouge et un spectre RAMAN caractéristiques. Pour le groupe D_{3h} (le mode plan avec égalité des liaisons C-O et des angles) les modes vibrationnels fondamentaux que montrent la spectroscopie RAMAN et IR constituent 2 modes dégénérés simples (singly) : A'_1 et A''_2 et 2 modes E' doublement dégénérés. Un nombre faible d'harmoniques peuvent être présents. (voir tableau ci-dessous).

Les environnements locaux ont une grande influence. Par exemple dans l'aragonite, le carbonate a un site de symétrie C_s augmentant les petits dédoublements des mode ν_3 et ν_4 et faisant apparaitre les bandes ν_1 dans le spectre infrarouge. Dans d'autres carbonates, des dédoublements plus importants des modes dégénéres peuvent être amenés par une coordination unidentée (affectant une liaison C-O) ou bidentée (affectant deux liaisons C-O) entre le carbonate et un ion métallique ou un ion hydrogène (NAKAMOTO 1957). Dans ce cas, la symétrie moléculaire de CO_3^{2-} est réduite à C_{2v} ou C_s. Généralement, losque des effets de symétrie moléculaire apparaissent, le degré de dédoublement peut être relié à la différence

de la longueur de la liaison C-O. Les plus longues liaisons C-O résultent des coordinations plus fortes des oxygènes aux cations.

MODES VIBRATIONNELS INTERNES DE L'ANION CARBONATE
d'après LIESE et VERWEIJ

Description	Mode	classe de symétrie D3h	absorption en cm-1	activité idéale
symétrie C-O *valence* (stretching)	v1	A'1	1050-1090	Raman
[CO3] *déformation* hors du plan (out-of-plane)	v2	A"2	860-880	IR
assymétrie C-O *valence*	v3	E'	1600-1300	Raman et IR
[CO3] *déformation* dans le plan (in-plane)	v4	E'	740-680	Raman et IR
harmonique	2 v2	A"1	1770-1740	R

2-1. LES PRINCIPALES BANDES INFRAROUGES DE L'OS TRABECULAIRE

Le spectre IR de l'os iliaque *trabéculaire* **(figure 9)** a été acquis en réflexion diffuse suivant le protocole indiqué dans la partie II. Le témoin est un homme de 24 ans.

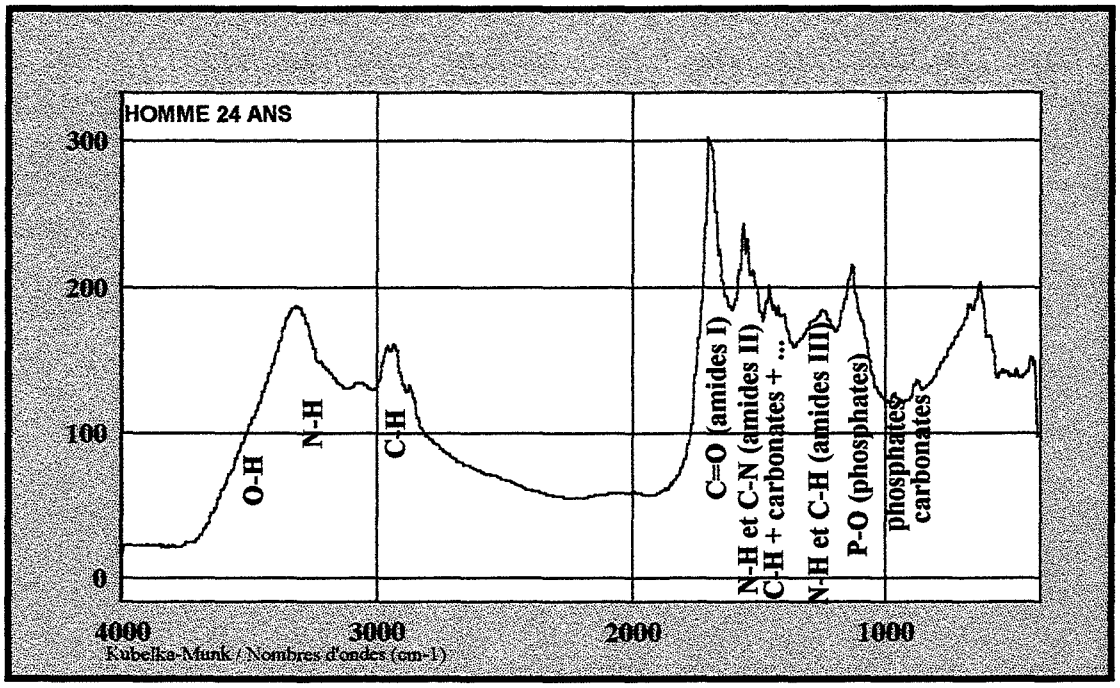


figure 9

La région ν_3 des phosphates est dominée par une bande intense à 1128 cm^{-1}. La région ν_4 des phosphates est dominée elle aussi par une bande à 625 cm^{-1} qui semble coordonnée à celle de 1128 cm^{-1}. En effet, suivant l'âge, comme nous l'observerons plus loin, ces bandes tendent à disparaître et mettent alors en évidence d'autres bandes dans la région ν_3 des phosphates et la région ν_4 présente alors un "dôme arrondi". C. REY et al. ont déjà observé cette disparition suivant l'âge et la maturation des apatites biologiques ou des apatites synthétiques faiblement cristallisées***(89)***. Ce spectre global de l'os c'est à dire comprenant l'ensemble des absorptions (minérales et organiques) ne peut donner qu'une indication très grossière. Néanmoins, "l'allure du spectre" demeure significative.

Deux massifs sont situés autour de 1685 et 1550 cm^{-1}. La bande vers 1680 cm^{-1} est généralement attribuée à la vibration de valence de la liaison peptidique C=O des amides (amide I). La bande vers 1550 cm^{-1} correspond à la contribution de la vibration de valence *(stretching)* C-N et de la vibration de déformation dans le plan *(in plane bending)* de N-H (amide II). Dans cette zone on trouve aussi la bande ν_2 de l'eau ainsi que les vibrations des liaisons C=C (faibles).

Le massif 1456-1398 cm^{-1} est très complexe : d'une part il fait partie de "l'empreinte digitale du spectre" c'est à dire dans une région où des combinaisons de bandes et des harmoniques peuvent se produire et d'autre part il comprend les bandes *les plus importantes et significatives des carbonates* **(figure 8)** ainsi que les bandes de déformations de toutes les liaisons C-H (CH_2 et CH_3) de la matière organique. Malheureusement cette région nous est interdite car elle est trop sujette à des erreurs et pour les carbonates nous suivons l'exemple de C.REY et al.*(90-91)* en nous intéressant à une bande des carbonates plus petite mais, en principe, moins sujette à des polémiques qui est la bande vers 875 cm^{-1} et que l'on aperçoit assez bien isolée sur le spectre.

La bande à 961 cm^{-1} correspond à la fréquence ν_1 des phosphates qui, bien qu'étant la vibration symétrique très bien observée en Raman *(117)*, l'est aussi en spectrométrie infrarouge et particulièrement en réflexion diffuse où elle est relativement bien définie.

Le massif vers 1242 cm^{-1} est toujours attribuée à la matière organique -amide III-. Cependant il faut signaler que ce domaine appartient lui aussi à de très fortes absorptions de la brushite, de la monétite mais aussi - de façon moindre - de l'hydroxyapatite.

La bande large centrée sur 3321cm^{-1} se réfère aux liaisons O-H et N-H.

Les liaisons C-H (vibrations de valence symétriques et antisymétriques de CH_3 et CH_2) contribuent au massif de 3000 à 2800 cm^{-1}.

Le massif vers 2000 cm^{-1} est celui des combinaisons de bandes et harmoniques de l'hydroxyapatite (et de l'OCP). Le massif vers 3070 cm^{-1} est attribuée généralement à la matière organique de l'os (bande amide).

Les spectres présentent souvent un épaulement vers 667-668 cm^{-1} et de faibles bandes vers 2320 cm^{-1} qui sont dûes à une mauvaise compensation avec la référence (variation de la teneur en dioxyde de carbone dans l'atmosphère du laboratoire). *Dans le cadre de cette étude*, elles ne sont pas trop gênantes.

En conclusion, un tel spectre est très complexe : en effet, trop de bandes des divers composés (du minéral à l' organique) se chevauchent et l'on comprend pourquoi les études des tissus osseux sont effectuées en infrarouge avec une déminéralisation ou au contraire en enlevant la matière organique. Nous allons essayer, dans ce travail, d'aborder ce problème en évitant un traitement de l'échantillon. La spectrométrie FTIR autorise les traitements mathématiques des spectres qui permettent, en particulier avec la déconvolution, d'obtenir une meilleure définition des bandes. C. REY et al. ont déjà utilisé ces méthodes dans le domaine de l'os *(17-18-90-91)*. Une grande prudence est alors nécessaire comme nous l'avons déjà mentionnée au chapitre II - paragraphe 2-1-2-2 page 28).

Nous présentons des spectres d'os déminéralisés **en annexe.** Ces déminéralisations, conseillées par A. BOSKEY pour obtenir un étalon de collagène humain de type I des tissus osseux ont été effectuées au LBTO par N. LAROCHE. En outre elles ont permis de mettre en évidence (en spectrométrie infrarouge) les *zones* minérales et les *zones* organiques et de ce

fait, sont très intéressantes ***(130)***. Néanmoins, des composés sont sûrement altérés et nous n'avons pas donné une affectation précise de ces bandes.

Avant de procéder aux traitements mathématiques, *les influences d'un certain nombre de paramètres sont étudiées.*

2-2. INFLUENCE DE L'ACQUISITION

2-2-1. EN REFLEXION DIFFUSE - ACQUISITION DIRECTE -

Le spectre d'un témoin de 24 ans est acquis suivant la méthode définie au chapitre II - paragraphe 2-1-2-1 page 26. Plusieurs acquisitions de 4000 à 450 cm^{-1} sont effectuées afin de vérifier la reproductibilité de la manipulation et l'homogénéité de l'échantillon (dans un proche domaine spatial). Nous avons aussi vérifié, par microscopie électronique à balayage, que le tissu osseux se prêtait, de par la dimension de ses cristaux, à l'acquisition en réflexion diffuse sur un échantillon massif. (photographie prise au microscope électronique à balayage **en annexe**).

2-2-2. EN REFLEXION DIFFUSE - SUR SUPPORT ABRASIF -

Des pastilles autocollantes abrasives, réfléchissantes permettent de faire de la réflexion diffuse de la manière suivante : La référence est acquise sur le support puis l'on abrase l'échantillon et l'on acquiert le spectre normalement. Cette méthode est très largement utilisée dans le domaine des plastiques, des vernis, des adjuvants, et en général toutes les fois que l'on veut identifier un produit sans détruire le support ou que l'on veut privilégier la surface pour avoir une bonne précision (oeuvres d'art : peintures, archéologie...).

En suivant le protocole décrit ci-dessus, nous avons acquis le spectre du même fragment osseux que précédemment. (paragraphe 2-2-1).

2-2-3. EN REFLEXION - MICROSCOPIE / IRTF

Le spectre du même fragment osseux que ci-dessus a fait l'objet d'une observation au microscope UMA 500. Le couplage microscope-spectromètre infrarouge permet d'acquérir différents spectres infrarouges dans des zones plus ou moins "hétérogènes" visuellement.

Avec cette technique l'acquisition peut se faire en absorption ou en réflexion. Nous avons choisi la méthode de réflexion qui est utilisée, par exemple, dans le cas où l'on veut détecter une usure ou une oxydation (aile d'avion, pièce mécanique particulière...) sans "mise en forme" de l'échantillon sous peine de modifier l'analyse.

Le protocole opératoire est le suivant : l'échantillon est visualisé puis un système de volets est actionné limitant la zone d'acquisition. Evidemment, elle ne peut pas être

inférieure à la longueur d'onde du rayonnement infrarouge. Cette technique semble bien adaptée à l'analyse d'un matériau hétérogène tel que l'os.

Cependant, l'utilisateur doit posséder une bonne connaissance des produits *susceptibles* d'être présents. En effet, plus les zones d'observation sont étroites et plus des produits mineurs peuvent être identifiés d'où *l'impossibilité d'effectuer ces analyses d'une manière routinière*. L'acquisition dans notre cas se situait entre 4000 et 700 cm^{-1} (2.5 à 14,2 µm).

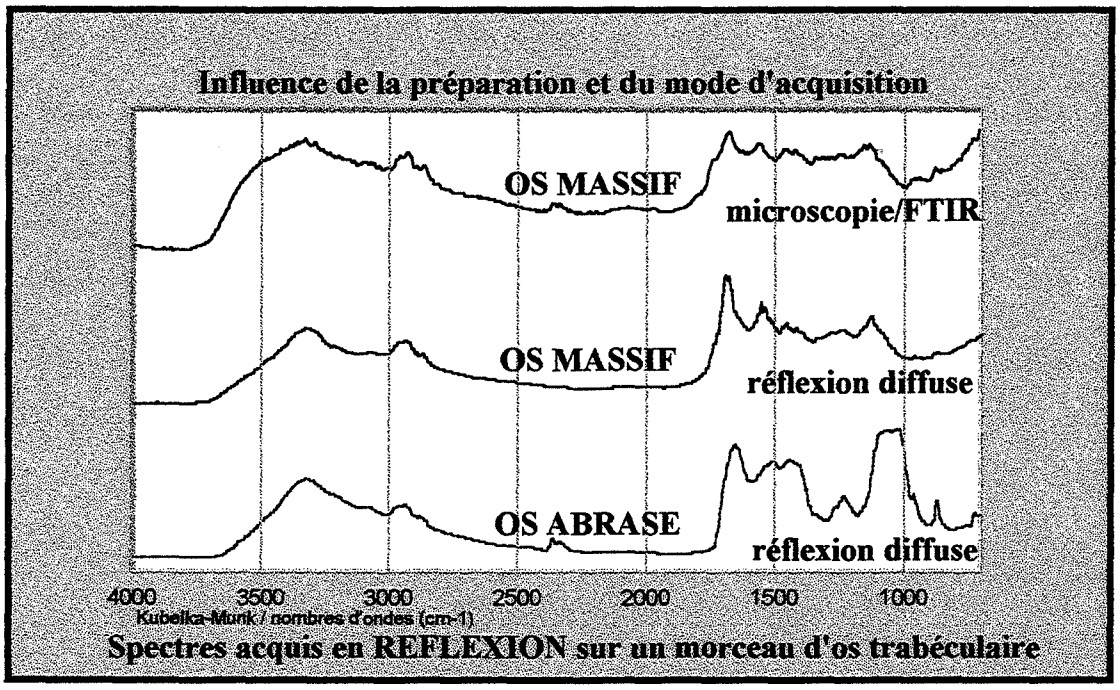


figure 10a

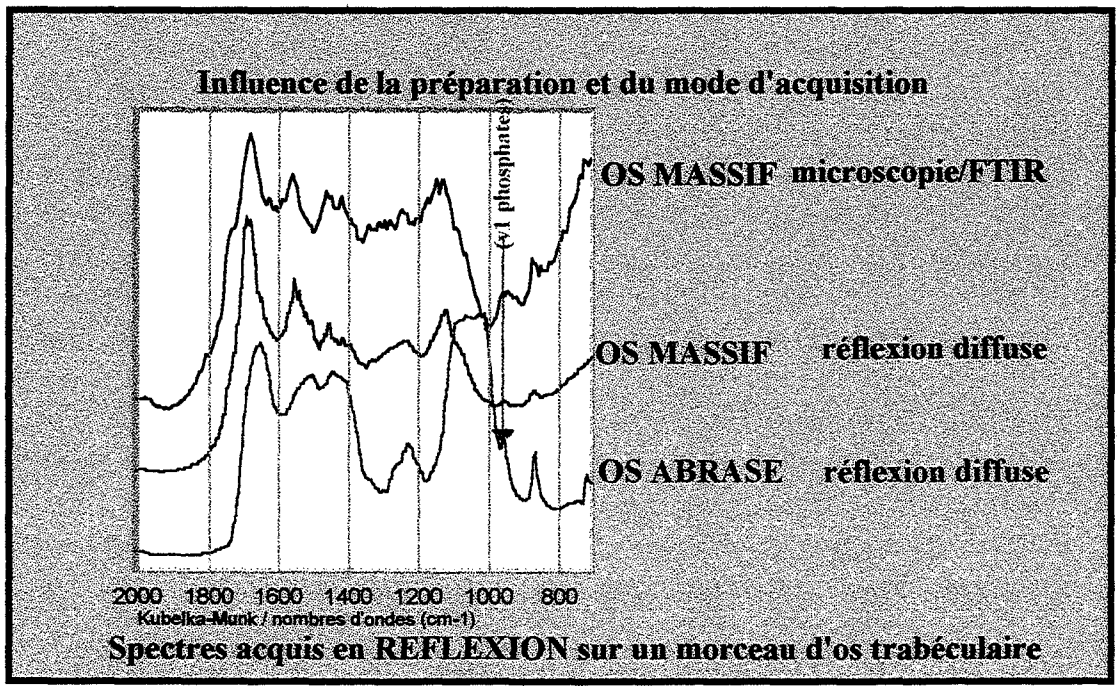


figure 10b

2-2-4. COMMENTAIRES (figures 10a, 10b, 10c et 10d)

En observant les **figures 10a** et **10b** on peut se rendre compte que *l'échantillon abrasé semble très différent des deux autres spectres* : La bande ν_1 des phosphates à 960 cm^{-1} n'est plus qu'un épaulement de la large bande ν_3 (bande commune de tous les phosphates) qui s'est déplacée vers les faibles nombres d'onde. Les rapports d'intensité des massifs dans les zones 1500-1300 cm^{-1} sont différents.

A partir de 875 cm^{-1} les absorptions du spectre abrasé présentent de grandes différences avec les deux autres acquisitions lesquelles présentent des absorptions supplémentaires vers 700 cm^{-1}). La bande C=O vers 1690 cm^{-1} s'est aussi déplacée vers les faibles nombres d'onde (1650 cm^{-1}).

Le spectre *abrasé* présente des similitudes avec les spectres acquis avec la méthode classique de pastillage dans le KBr (*homogénéisation et broyage à basse température* pour éviter une altération du matériau puis *forte compression* dans une presse pour obtenir une pastille transparente de KBr).

Les deux spectres acquis *sans aucune préparation*, avec l'accessoire de réflexion diffuse d'une part et avec l'accessoire de microscopie d'autre part, présentent *de grandes similitudes* :

1) au niveau de la forme des bande,
2) de la position des bandes,
3) du rapport des bandes entre elles,
4) des zones d'absorption après 850 cm^{-1}.

Toutefois, comme nous le verrons plus loin, la surface d'observation étant différente (microscopique et macroscopique) entre les deux spectres mentionnés ci-dessus, il est normal qu'ils présentent quelques petites différences.

Ces similitudes et différences posent des problèmes troublants.

1) *l'accessoire de réflexion diffuse ne donne pas le même spectre suivant que l'échantillon a subi ou n'a pas subi une abrasion pour l'acquisition du spectre.*

2) *l'accessoire de microscopie donne sensiblement le même spectre que l'accessoire de réflexion diffuse si l'échantillon est sans abrasion.*

La figure 10c concerne les deux spectres acquis en réflexion diffuse dans les domaines 4000-400 cm^{-1} (la microscopie ne permettant pas d'opérer au-delà de 700 cm^{-1}).

Le spectre de l'os abrasé est tracé en essayant de maintenir approximativement la même valeur d'absorption pour la bande minérale des carbonates, à 875 cm^{-1}. La figure 10c fait alors apparaitre, *pour l'échantillon massif*, des pics exaltés dans la région des vibrations de valence O-H et N-H (3800-3000 cm^{-1}), dans la région des liaisons C = O (1750-1600 cm^{-1}) et dans la zone spectrale au-delà de 800 cm^{-1}. Cette dernière absorption masque le doublet qui est mentionné généralement dans les spectres infrarouges des échantillons osseux et qui, par contre, apparait très bien sur le spectre de *l'échantillon abrasé*.

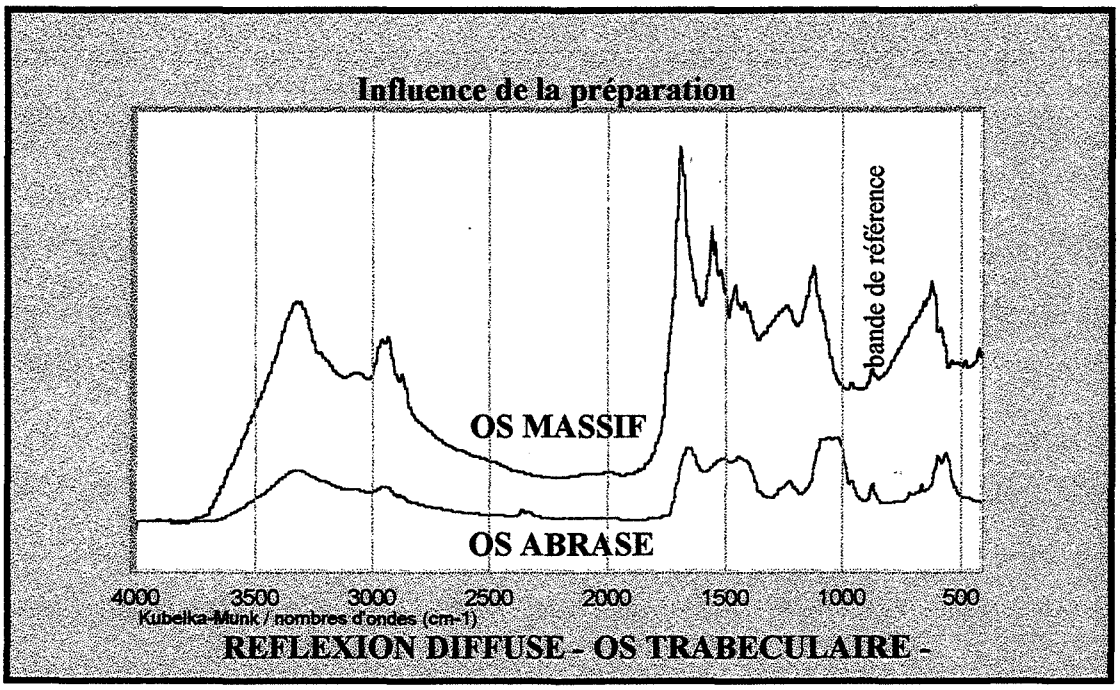


figure 10c

G.R SAUER et R.E WUTHIER en 1988 observent *(93)*, durant la minéralisation *in vitro* mais en simulation dans des vésicules [1], *l'exaltation* de toutes les bandes infrarouges. Les spectres minéraux étaient déduits par annulation des vibrations C-H dûes à la matière organique. Ces auteurs déduisent par la présence de complexes organo-métalliques. En 1993 ***(130)*** E.M RAIF et M.F HARMAND concluent que *le collagène n'est pas directement relié à la phase minéralisée* et que la plupart des protéines non collagéniques sont liées au collagène, la majorité ayant une grande affinité pour ce dernier.

Les différents essais que nous avons effectués sembleraient confirmer ces résultats. On peut admettre des hypothèses au niveau de l'observation :

1) les complexes sont fixés en surface et donc observés lorsque cette dernière est privilégiée par rapport au volume.

2) les traitements des échantillons, avant l'analyse, détruisent ou masquent ces complexes.

Il est évident que *pour vérifier ces hypothèses*, des études complémentaires sont nécessaires.

[1] « MV : matrix vesicles » sont connues pour être responsables de l'induction du *de novo* mineral dans la croissance épyphyséale du cartilage et dans d'autres tissus minéralisés. La microscopie électronique a montré que les premiers cristaux d'hydroxyapatite apparaissaient sur la surface des membranes MV.

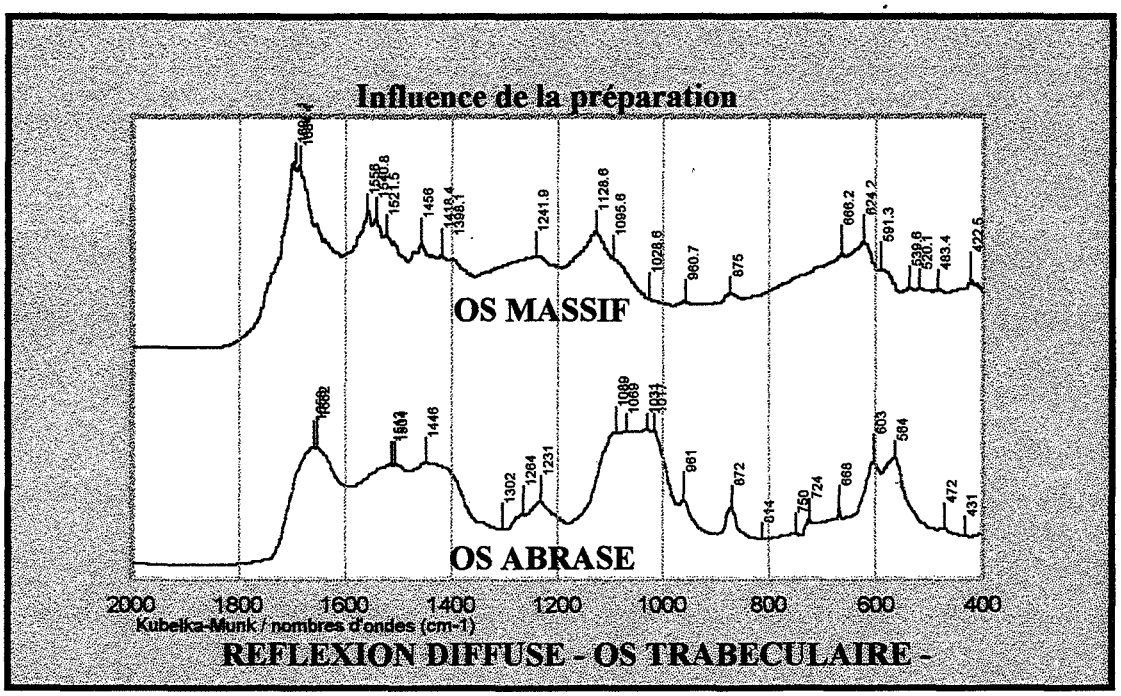


figure 10d

La figure 10d, présente la région 2000-400 cm^{-1}.

Cette figure met en évidence toutes les différences dûes à ces deux types d'acquisition. Le spectre de l'os abrasé est surestimé en absorption si l'on admet la même absorption pour la bande des carbonates à 875 cm^{-1}.

2-3. L'HETEROGENEITE (figure 11)

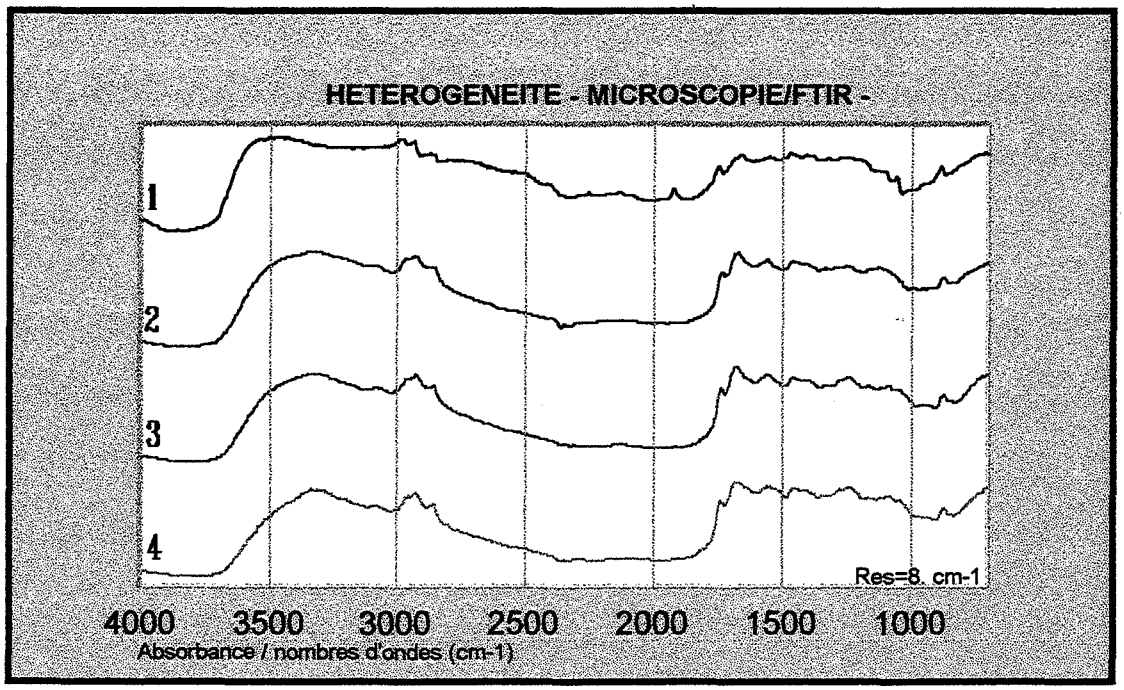


figure 11

Cette hétérogénéité est mise en évidence avec la microscopie associée à la spectrophotométrie infrarouge. Pour l'acquisition nous avons parcouru des zones semblant *visuellement* différentes mais nous ne nous sommes pas investis dans un processus d'identification.

C'est une technique particulièrement adaptée à la caractérisation des matériaux hétérogènes comme les os. Des publications récentes y font référence *(94 à 100)*.

2-4. LA LOCALISATION DE L'OS (figure 12 -13)

Des fragments d'os du crâne, de la crête iliaque et d'une côte ont été prélevés chez une femme de 45 ans et un homme de 47 ans.

La minéralisation du tissu osseux est mise en évidence en examinant les bandes ν_3 des phosphates (vers 1100 cm^{-1}) et nous remarquons que le crâne possède une bande très importante dans cette région. Cette bande diminue dans l'os de la crête iliaque et se trouve encore plus faible dans la côte. Cette étude démontre aussi toute la complexité du tissu osseux qui, suivant sa fonction et sa localisation, présente des différences importantes.

Une étude, suivant le sexe ou l'âge, sur ces différentes localisations d'os chez le même individu n'a encore jamais été réalisée (à notre connaissance) d'un point de vue physico-chimique.

Ces différences démontrent la nécessité dans toute étude de l'os d'indiquer la localisationt du prélèvement. Des comparaisons et surtout des analogies avec des os situés différemment seraient très risquées.

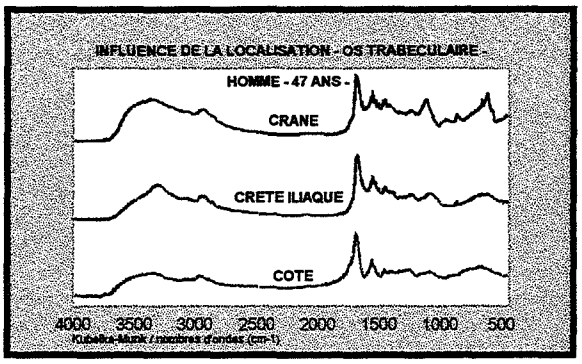


figure 12

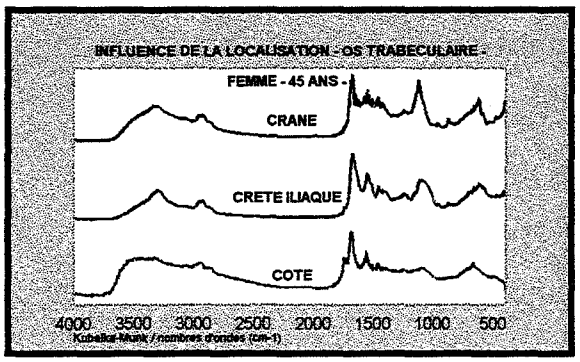


figure 13

2-5. L'AGE

Des biopsies sont efféctuées sur 27 témoins humains dont 6 femmes. Les sujets, décédés de mort violente, ne présentaient pas d'anomalies, à priori. Le mode opératoire a été décrit dans la partie II.

Une très grande diversité des spectres est mise en évidence suivant les sujets. En effet, le remaniement est différent suivant l'âge et le minéral peut être plus apatitique chez un témoin jeune ou au contraire en cours de maturation chez un témoin plus âgé. Toutefois, statistiquement un jeune témoin aura préférentiellement un minéral "jeune" puisque son remaniement est plus rapide.

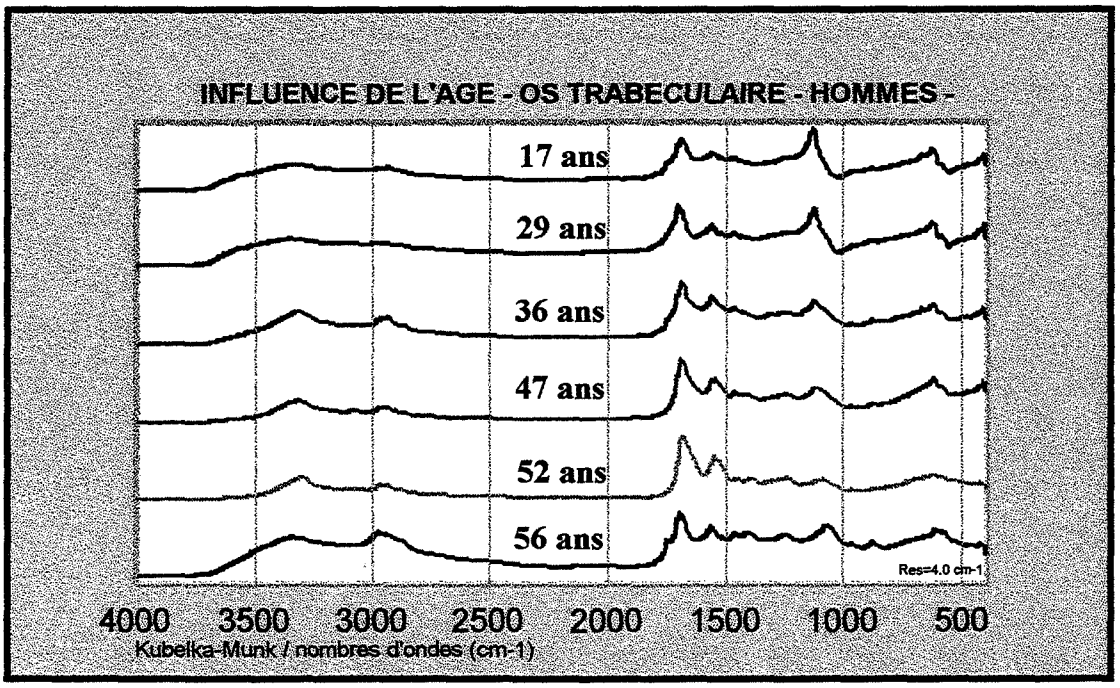


figure 14a

Il existe une *nette* tendance dans le changement du minéral osseux avec l'âge que met en évidence **les figures 14a et 14b.** Ainsi que le décrivent C. REY et al. ***(89)*** l'environnement non-apatitique (1125 et 625 cm^{-1}) décroît avec l'âge et ceci est particulièrement visible chez les hommes. Un net changement de cet environnement se situe après la cinquantaine. Des vibrations C-H (3000-2800 cm^{-1}) chez le témoin de 36 ans et le témoin de 56 ans indiquent une proportion plus forte de matière organique que de matière minérale.

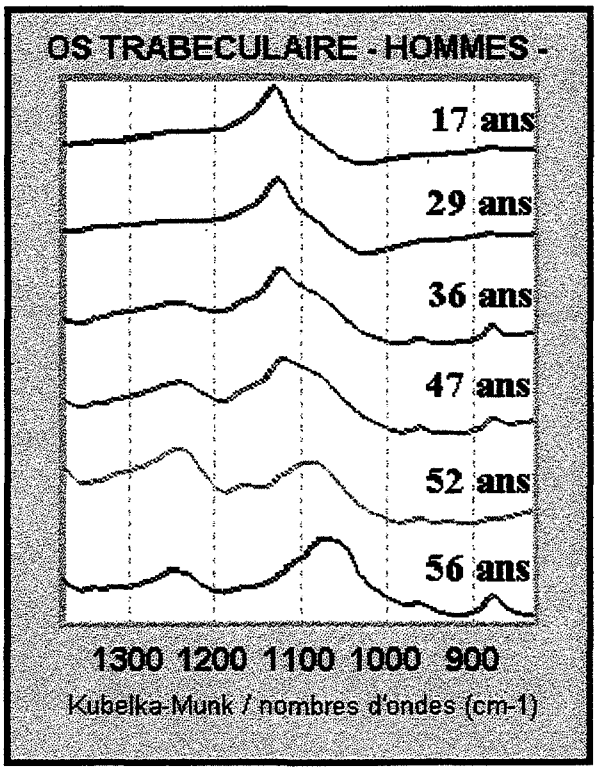


figure 14b

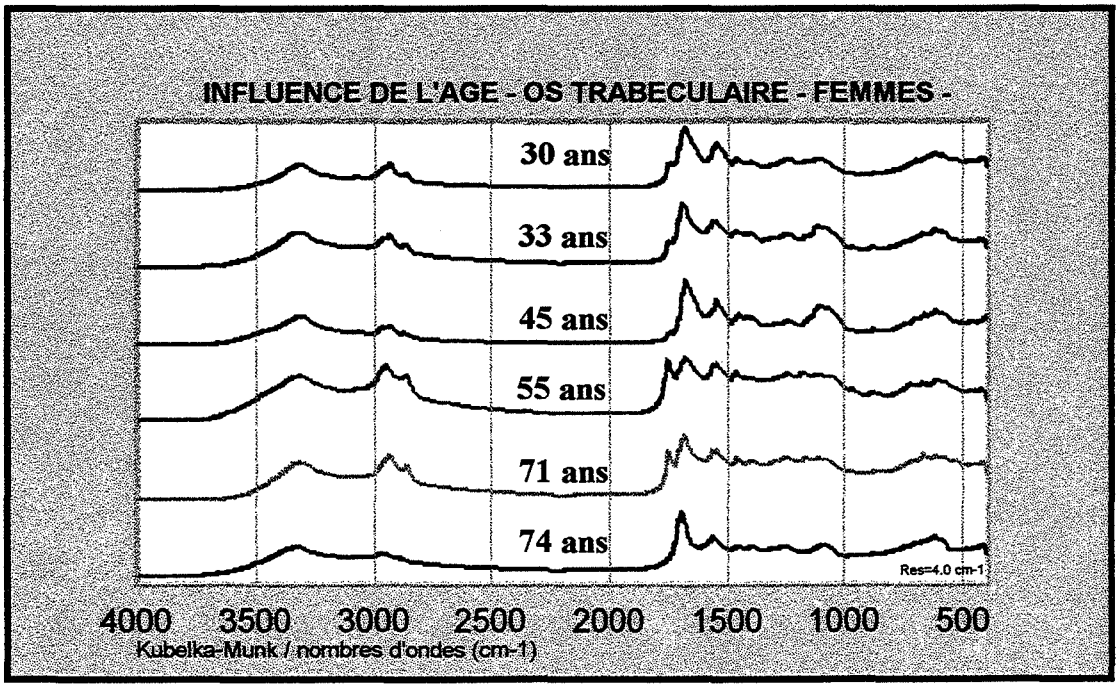


figure 15a

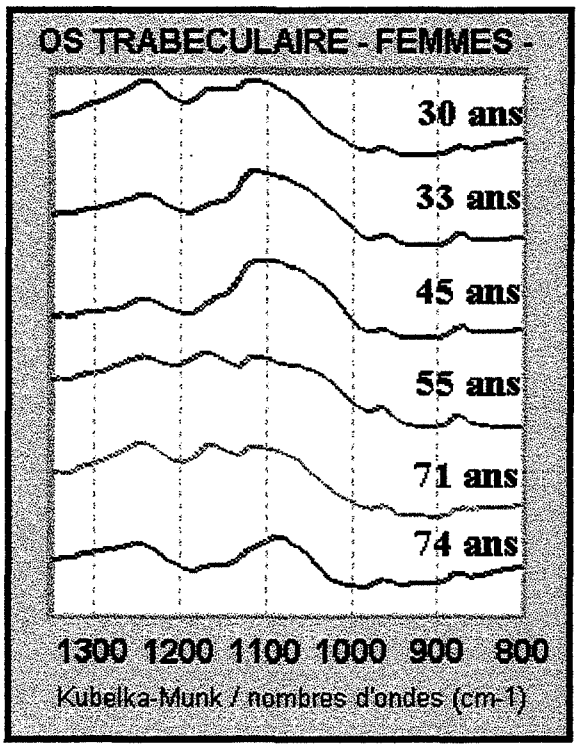


figure 15b

Chez les femmes **(figure 15a et 15b)** l'âge du plus jeune témoin, 30 ans, diminue la netteté du résultat. Nous remarquons néammoins que le massif d'absorption dans la région ν_3 des phosphates (vers 1100 cm^{-1}) est plus important jusque vers la cinquantaine. La bande qui apparait quelquefois vers 1745 cm^{-1} est attribuée dans la littérature aux liaisons C=O des esters.

Les figure 16a et 16b présentent cinq spectres d'os trabéculaire de jeunes gens de 15 à 23 ans. L'environnement non-apatitique dans la région d'absorption des phosphates de quatre d'entre eux est important. Cet environnement est moindre chez le témoin de 23 ans Ces figures pourraient, compte tenu de la jeunesse des sujets, être indicatrice *d'une certaine reproductibilité des mesures* puisque, statistiquement d'après la rapidité du remaniement, ils présenteraient des phases minérales à peu près identiques (précurseurs ou autres). Le choix de la jeunesse est aussi guidé par, en principe, une absence de dégâts causés par le tabagisme et l'alcoolisme (ces présences ont été quelquefois signalés chez nos témoins...). L'âge, surtout vers le milieu de la vie, n'est pas un paramètre « mathématique » : Les os d'un témoin de 45 ans ne présentent pas *automatiquement* une *qualité inférieure* à celle d'un témoins de 35 ans.

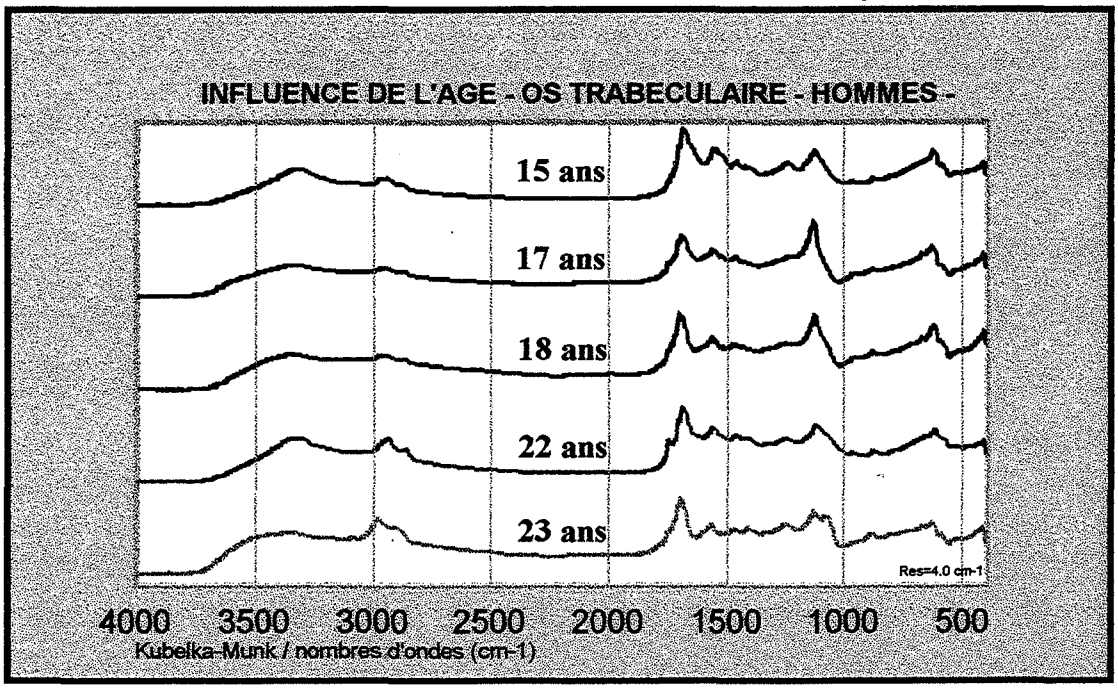


figure 16a

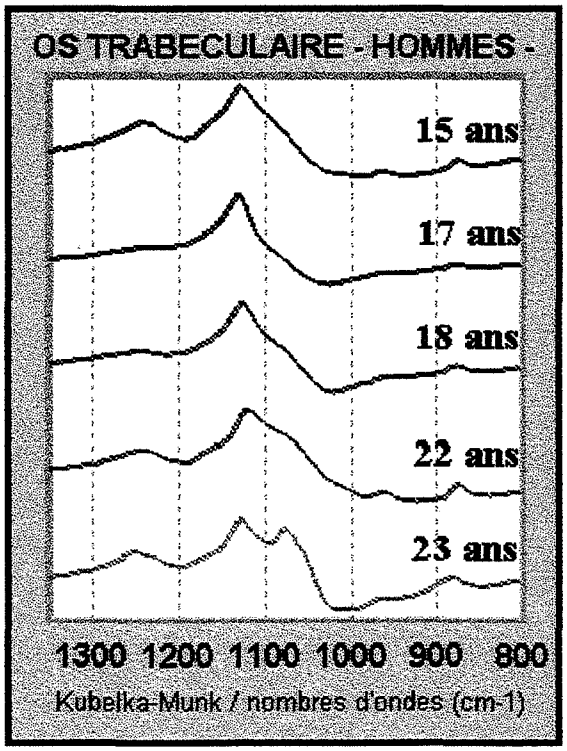


figure 16 b

2-6. L'ACQUISITION ET LE FACTEUR TEMPS

Trois échantillons prélevés sur des biopsies de patients (et non de témoins décédés) ont présenté, à l'acquisition, un spectre différent des autres prélèvements : bandes importantes dans la région des vibrations des liaisons C-H (matière organique) corrélées à une forte bande centrée sur 1068 cm^{-1}. Nous avons aussi observé une absorption plus importante dans le domaine de la vibration des carbonates à 875 cm^{-1}. Nous *avons supposé*, pour les tracés de ces deux spectres acquis sur le même échantillon à 50 jours d'intervalle, l'égalité des bandes C=O et N-H dans la région de 1650 -1550 cm^{-1}.

La figure 17 représente un de ces 3 cas : le spectre 1 avec l'acquisition du spectre infrarouge peu de temps après la biopsie (non contrôlé mais inférieur à 2 jours) et le spectre 2 avec l'acquisition effectuée 50 jours après l'acquisition du spectre 1..

Le spectre 2 est voisin des spectres des tissus osseux humains observés. La « réaction de transformation spectre 1 - spectre 2» a eu lieu pendant l'intervalle des 50 jours...Nous ne sommes pas en mesure de connaitre relativement précisément « le moment » de la conversion du spectre 1 en spectre 2. Cette étude sortait du cadre de ce travail.

Néanmoins, Il pourrait être intéressant de s'assurer si, d'une part ce phénomène est relié au temps écoulé entre la biopsie et l'analyse et si d'autre part le paramètre durée de la transformation est le même pour chaque individu.

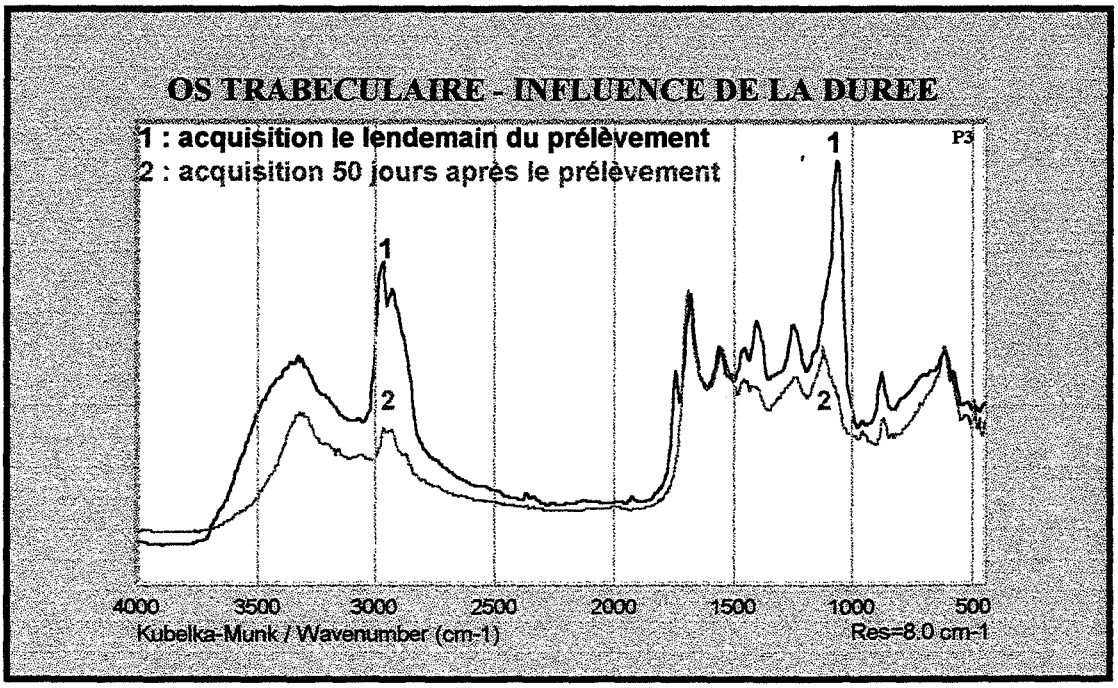


figure 17

2-7. LA PATHOLOGIE (figure 18a, 18 b et 18c)

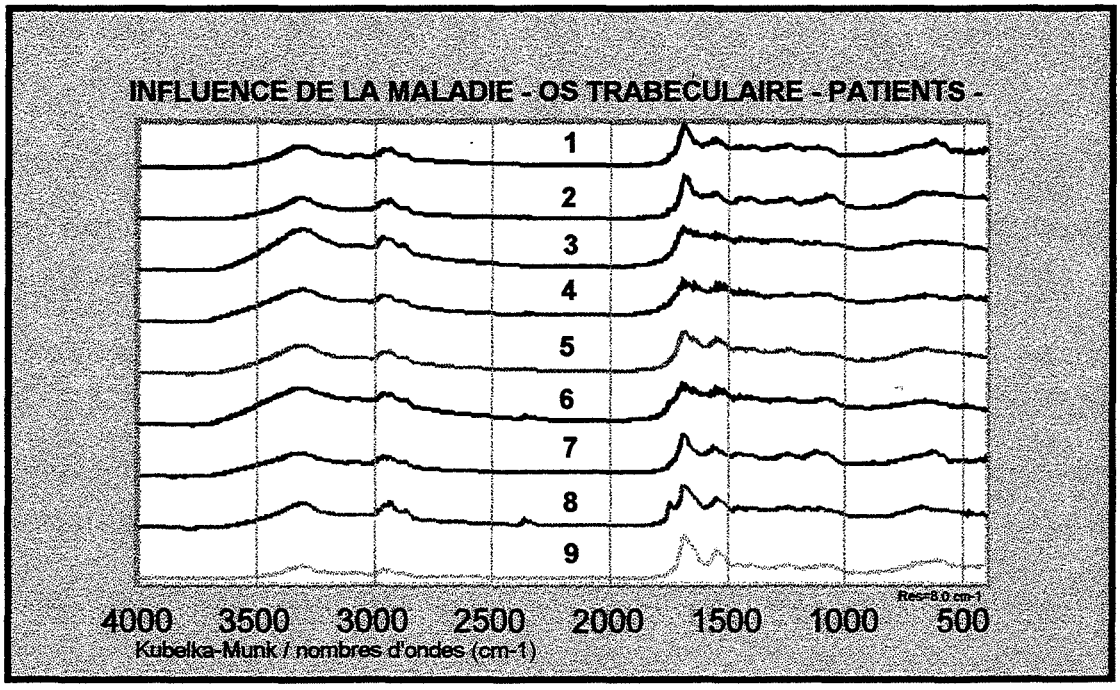


figure 18a

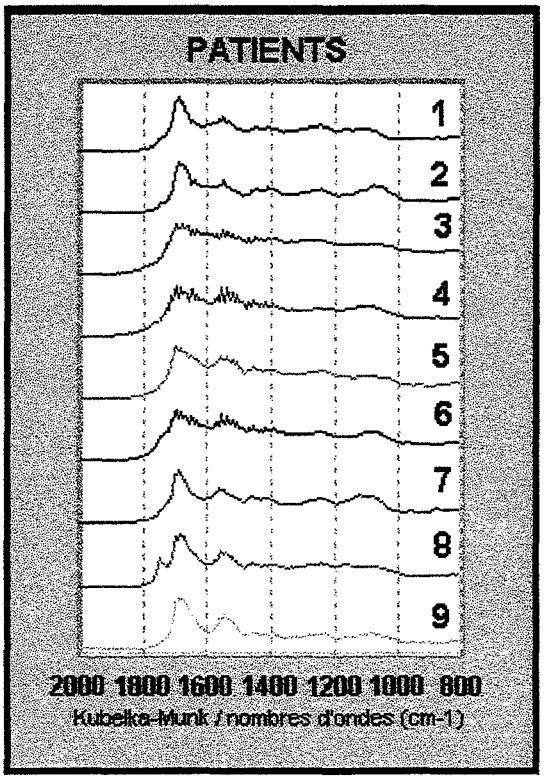


figure 18b

Des biopsies de patients ont été observées en réflexion diffuse sur les échantillons massifs, avec une résolution de 8 cm^{-1}. Quelques spectres sont présentés sur les figures 18a et 18b. *Des différences significatives*, dans la région des vibrations C=O (1700-1600 cm^{-1}), apparaissent pour les patients 3, 4 et 6. Des bandes d'absoption très détaillées sont visibles dans cette région. Ces observations sont en accord avec celles effectués avec les examens histomorphométriques, concernant les pertes osseuses. Sur les spectres des autres patients ou ceux des témoins (figures 14a, 15a et 16a) cette structure n'est pas si précise *et les bandes présentent une plus forte absorption.*

Ces patients sont âgés et la forte absorption dans la région de vibration des liaisons P-O (1200-1000 cm-1) est relativement réduite.

La figure 18c est une comparaison avec *des témoins.* Ces témoins n'ont pas *d'anomalie connue*, sont dans la tranche d'âge des patients et sont du même sexe.

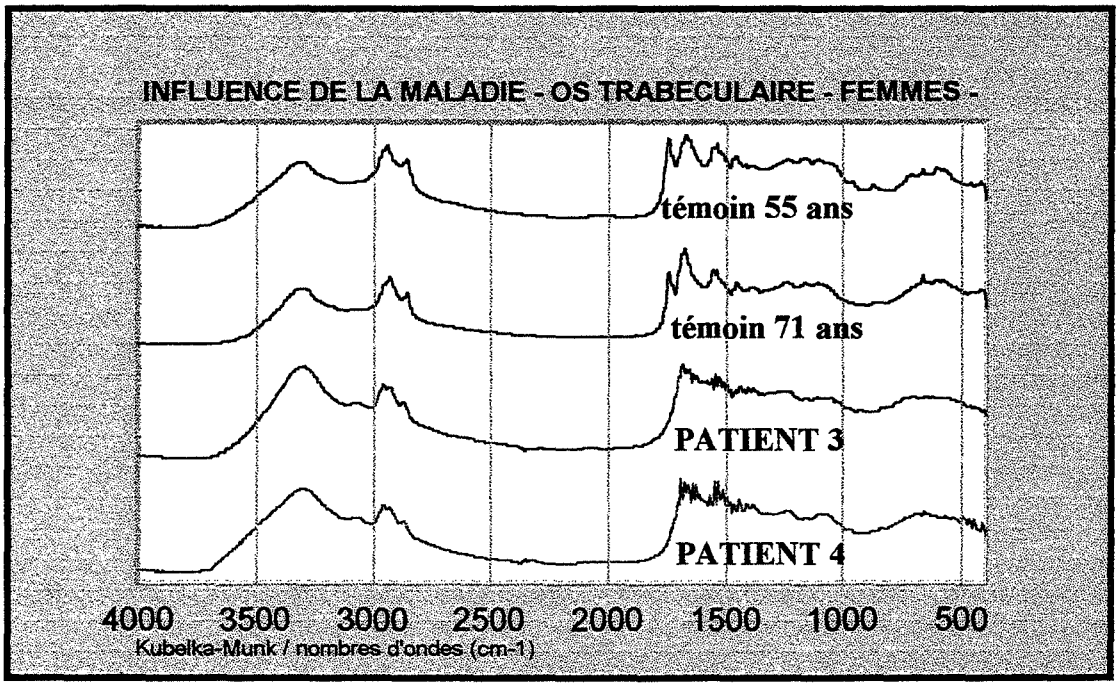


figure 18c

Nous n'avons pas approfondi cette étude. Nous désirons simplement faire remarquer que le changement du tissu osseux, dû à la pathologie, peut aussi être mis en évidence par analyse infrarouge.

Le changement dans les zones des amides (C=O vers 1650 cm^{-1}), relié à une déminéralisation visible dans la zone des phosphates (P-O vers 1100 cm^{-1}) est toujours en accord avec les travaux de SAUER ET WUTHIER (93).

Pour terminer nous présentons, pour observer les zones minérales et organiques, une déminéralisation sur un témoin de 36 ans. Il faut attirer l'attention sur le fait que l'os a dû

dans la région des amides une structure beaucoup plus définie après la déminéralisation comme c'est le cas chez les patients 3, 4 et 6 **(figure 18 d)**.

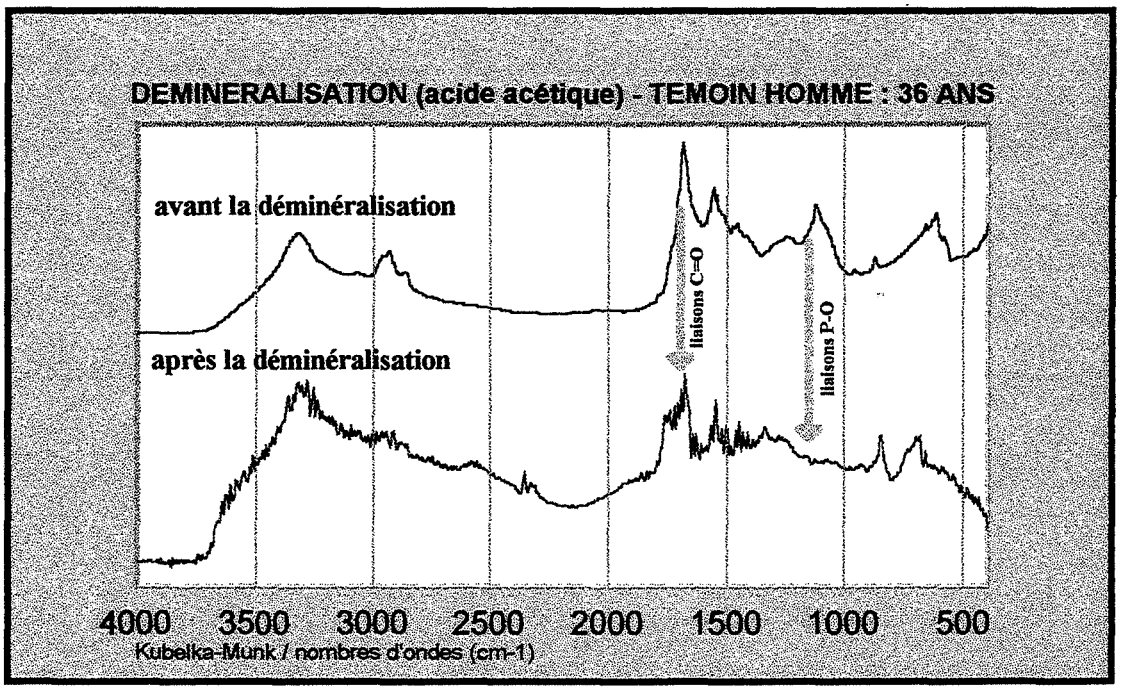


figure 18d

En résumé :

L'acquisition d'un spectre infrarouge, sans traitement de l'échantillon, nous permet d'observer des différences significatives dans un certain nombre de cas.

Ce travail a seulement pour but de montrer tout l'intérêt qu'offre la technique de réflexion diffuse, sur l'os massif. Elle permet une observation plus fine.

Le paragraphe suivant concerne les traitements mathématiques sur les spectres pour essayer d'obtenir d'autres informations que ne nous donne pas l'observation directe.

2-8. LES TRAITEMENTS MATHEMATIQUES DES SPECTRES INFRAROUGES

Nous avons observé la complexité des spectres infrarouges du tissu osseux. Toutes les bandes d'absorptions des différents composés sont additives. La FTIR permet de traiter mathématiquement les spectres d'acquisition (chapitre II paragraphe 2-1-2-2, page 28).

2-8-1. LES DECONVOLUTIONS

Les déconvolutions font partie des traitements mathématiques du signal qu'autorise la spectrométrie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier ***(128)***. Elles aident à l'identification des principales bandes d'absorption qui composent une bande complexe. En conséquence, les déconvolutions sont utiles pour déterminer le nombre de pics (bandes) dans une région donnée, la position de ces bandes d'absorptions ainsi que le calcul de leurs aires.

Nous n'aborderons pas le domaine théorique du traitement du signal (128). *Pratiquement,* les paramètres que l'utilisateur doit choisir concernent le domaine de déconvolution, la largeur imposée pour la déconvolution (par exemple HW = 20 cm^{-1}), un paramètre F ainsi qu'une fonction de lissage. Le choix de ces paramètres est dicté par le spectre *après* la déconvolution. Le paramètre de la demi-largeur à demi-hauteur (HW) peut provoquer, s'il est trop faible, une sur-déconvolution caractérisée par l'apparence de pics négatifs à la base des bandes et s'il est trop fort la déconvolution sera moins efficace. Le paramètre F contrôle l'efficacité de la déconvolution. Un paramètre élevé augmentera toute la résolution mais introduira de petites oscillations périodiques sur les bandes ainsi que sur la ligne de base tandis qu'un paramètre faible diminuera la sensibilité. La fontion de lissage peut-être soit BESSEL soit BOXCAR. Le choix de tous ces paramètres est presque toujours le résultat de différents compromis et de tâtonnements en fonction du spectre à déconvoluer.

En résumé, la déconvolution réduit la largeur des bandes infrarouges. Elle permet donc une observation plus sûre (bande au lieu d'un épaulement) et plus facile. Elle peut aussi être une étape avant d'effectuer un autre traitement mathématique : la désommation (en anglais : curve-fitting). Dans ce dernier cas, la déconvolution est un indicatif dans le traitement de la désommation puisqu'elle permet de trouver un *certain nombre* de bandes. Ce nombre est un paramètre de la désommation.

Différents essais, souvent laborieux, ont été effectués avant d'obtenir *« les bons paramètres »* pour les spectres des tissus osseux. Ces paramètres sont toujours indiqués sur les spectres.

Nous avons déconvolué les spectres de tous les témoins entre 1200 et 400 cm^{-1} (région de ν_3 ν_1 et ν_4 des phosphates et de ν_2 des carbonates) mais aussi dans le domaine de 1900-1500 cm^{-1}. Les résultats de ces dernières déconvolutions ne sont pas présentés dans le cadre de ce travail.

2-8-1-1. La région 1200-800 cm-1

Dans cette région nous avons opéré des déconvolutions pour avoir une meilleure caractérisation des spectres obtenues, l'identification des différentes phases minérales étant facilitée. Ces déconvolutions sont effectuées avec les paramètres suivants : de 1200 à 800 cm^{-1} avec HW = 20 ; F = 2 ; Bessel.

Plusieurs essais de déconvolutions ont été effectués, par exemple en faisant une correction de la ligne de base avant le traitement. En définitive, nous avons opté pour garder le spectre d'acquisition intact puisque nous n'avons pas utilisé ces spectres à des fins quantitatives.

Cette région déconvoluée nous permet d'observer plus précisément l'ensemble des deux vibrations ν_3 et ν_1 des phosphates (vers 1100 cm^{-1} et 960 cm^{-1}) ainsi que ν_2 (vers 875 cm^{-1}) des carbonates. Nous donnons (**figures 19 à 23**) quelques spectres significatifs ainsi que les *identifications possibles de phases*. Nous rappelons toutefois que nous ne sommes pas à l'abri d'artéfacts spectroscopiques c'est à dire d'interférences possibles entre les nombreuses absorptions provenant des multiples composés *connus ou inconnus* qui peuvent se produire et créer ainsi des combinaisons de bandes ou des harmoniques.

La figure 19 se réfère à l'os trabéculaire (os iliaque) d'un jeune homme de 15 ans. Nous remarquons un massif dominé par une très forte absorption à 1127 cm^{-1}, la présence de bandes pouvant être de l'OCP, du TCP et du DCPD.

La figure 20 se réfère à celui d'un homme de 29 ans et son spectre est proche sans toutefois être identique de celui du jeune homme 15 ans.

Les figures 21 et 22 concernent des hommes de 49 et 56 ans. Ces spectres sont très différents et présentent toutes les caractéristiques de l'OCP.

La figure 23 se réfère à l'os trabéculaire d'une femme de 55 ans et montre plusieurs phases susceptibles d'être en présence : du TCP à l'HAP en passant par l'OCP.

Tous ces spectres présentent de grandes différences entre eux et aucune étude statistique ne peut être faite car le nombre de témoins n'est pas représentatif (seulement 6 femmes) et 21 hommes. La très forte absorption vers 1127 cm-1, déjà observée sur les spectres non déconvolués, empêche chez les sujets jeunes une bonne observation du minéral dans cette zone.

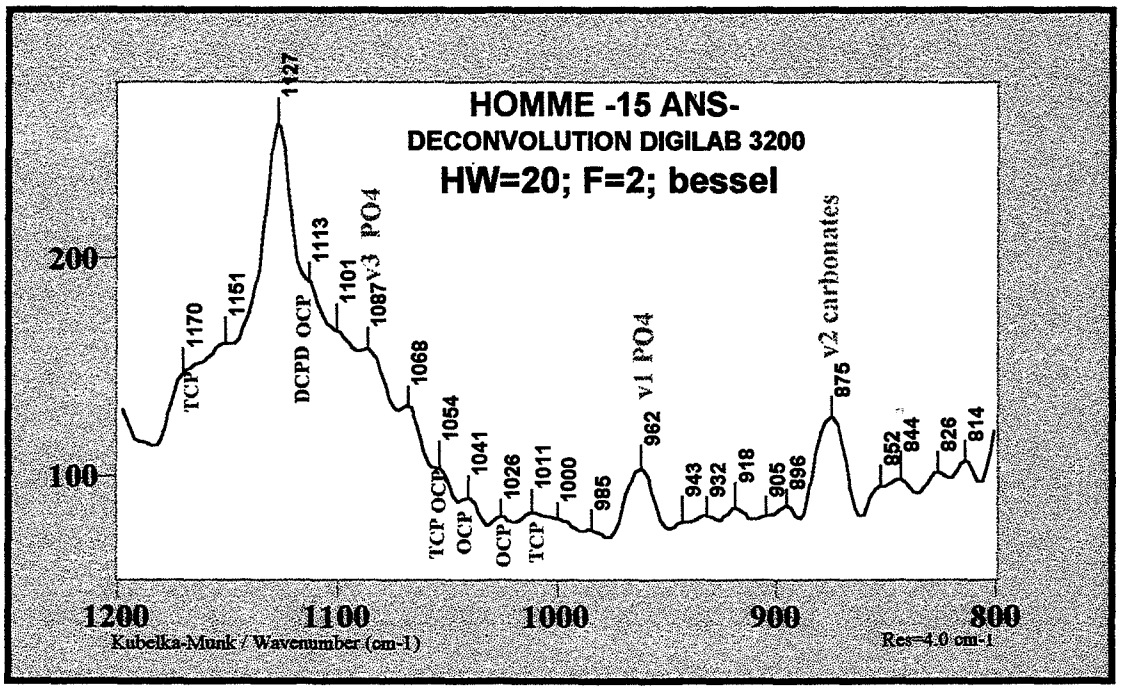


figure 19

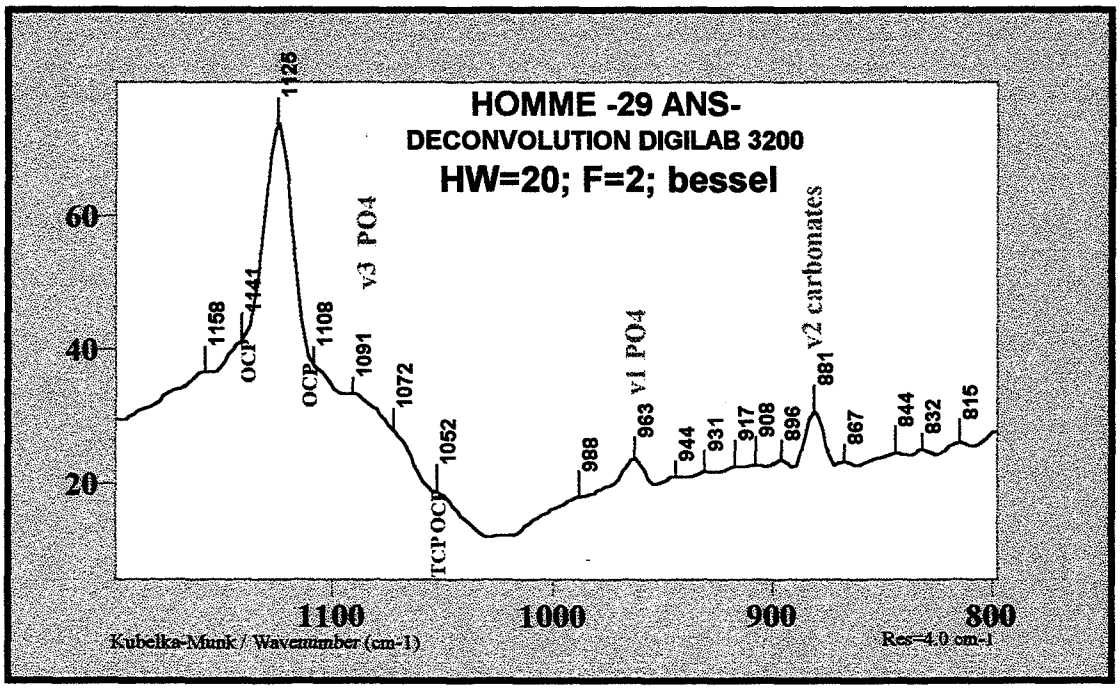


figure 20

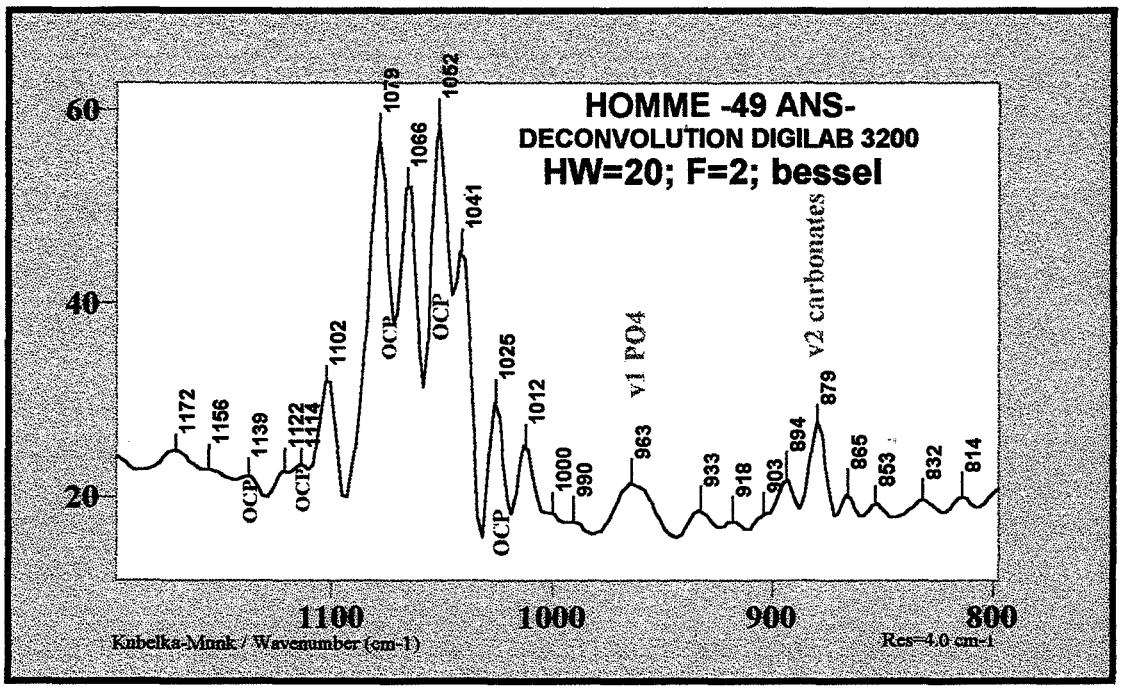


figure 21

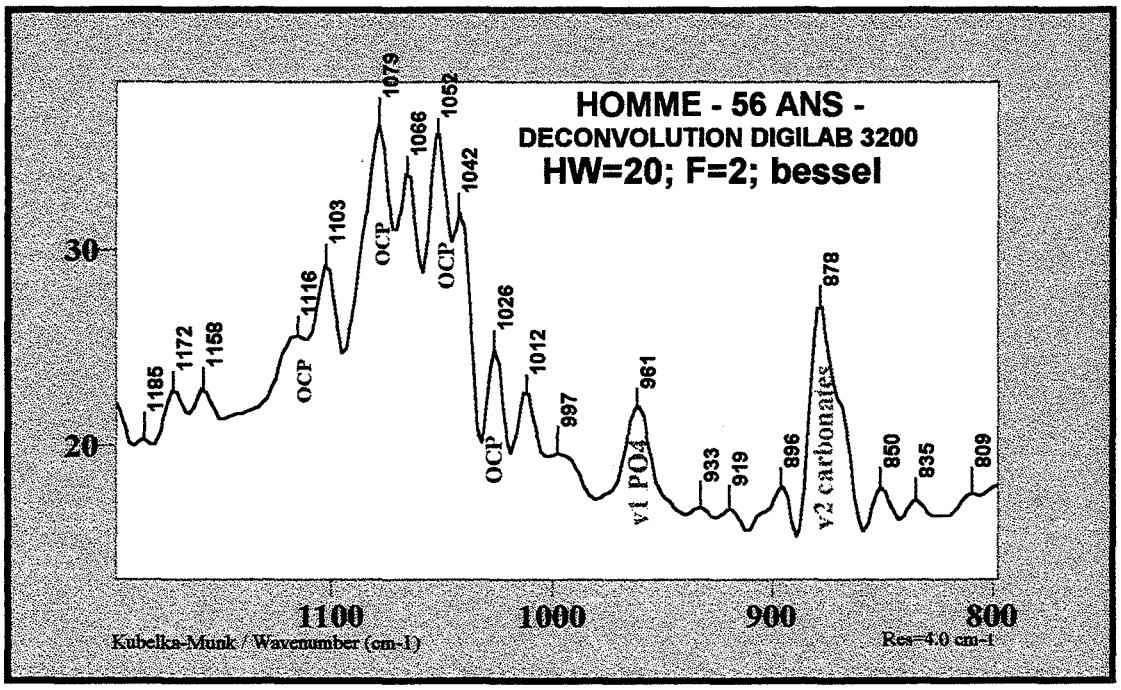


figure 22

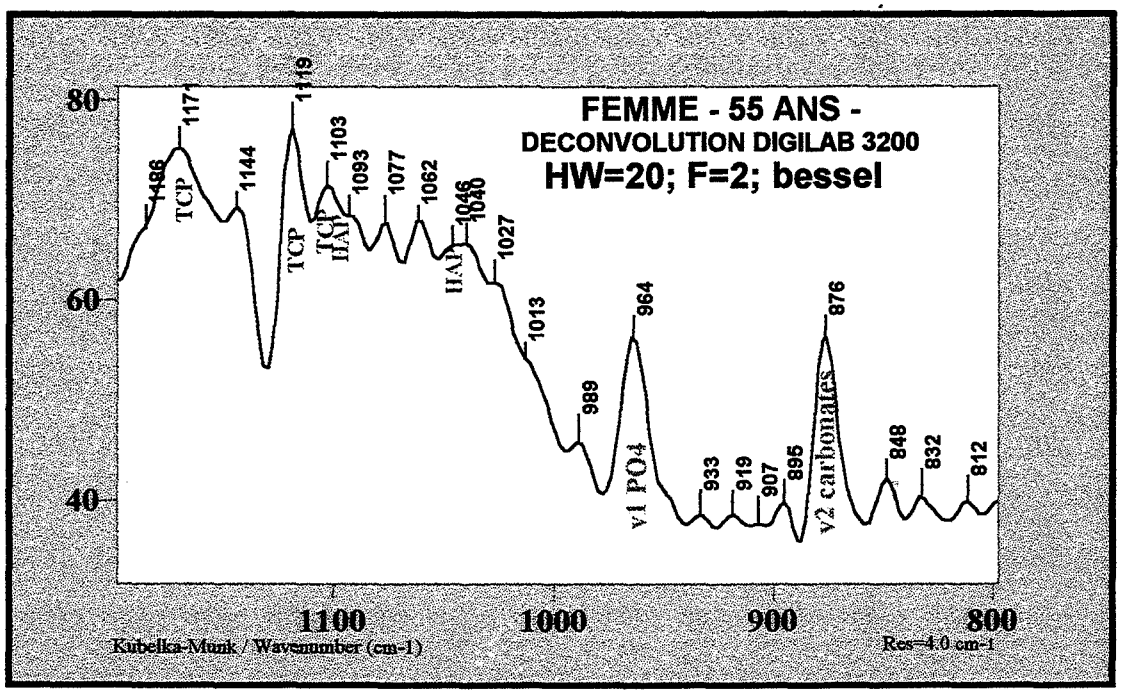


figure 23

2-8-1-2. L'intérêt des déconvolutions

Les spectres infrarouges *déconvolués présentent un intérêt incontestable d'un point de vue qualitatif*. L'identification de structure, par la forme et la position des bandes référencée est relativement aisée lorsque l'on possède des étalons. Ces bandes d'absorption indiquent :

1) La présence de certaines phases
2) Des glissements ou des disparitions de bandes
3) La stabilité de certaines bandes qui est plus facilement mise en évidence par la précision des nombres d'onde.

En définitive, cette méthode couplée avec l'acquisition directe en réflexion diffuse permet :

1) d'observer très facilement, lorsque l'on connait les différentes zones d'absorption, une altération possible du minéral osseux dans le cas où celui-ci serait absent ou sous une forme "anormale", autre que le phosphate de calcium.
2) la rapidité analytique *par rapport aux autres techniques classiques* qui demandent des préparations, des mises en solution, des broyages, des pastillages...
3) d'effectuer d'autres identifications physico-chimiques (surface spécifique, DRX, densitométrie...), biologiques ou autres *sur le même échantillon intact*.

La présence d'artéfacts n'est pas exclue. Un jugement critique est absolument indispensable avant l'affectation de tel composé à telle bande. En effet, une bande trouvée à une certaine longueur d'onde *n'implique pas nécessairement la présence d'un composé*. Le spectre infrarouge *doit*, en définitive, se considérer sur la totalité de son absorption.

Le jugement de valeur de la "normalité" ne peut se faire qu'après avoir observé des tendances sur des témoins sûrs et dont le nombre est le plus grand possible.

2-8-2. LES DESOMMATIONS *(«curve-fitting»)*

Le traitement mathématique de désommation permet une détermination du nombre de pics, calcule la fonction des pics (Lorentzienne, Gaussienne, Mix, Log Normal, Voigt et Exp Mod) et donne les paramètres des pics (coefficients etc...).

Nous présentons *à titre d'exemples* de ces traitements les **figures 24 à 27** qui sont des désommations de bandes (curve fitting avec le logiciel GRAMS *après avoir effectué les déconvolutions* avec la station DIGILAB 3200) dans la région de ν_3. **Les figures 24 à 26** concernent des hommes âgés respectivement de 17, 40 et 56 ans et la **figure 27** concerne une femme (notre plus jeune témoin féminin) âgée de 30 ans.

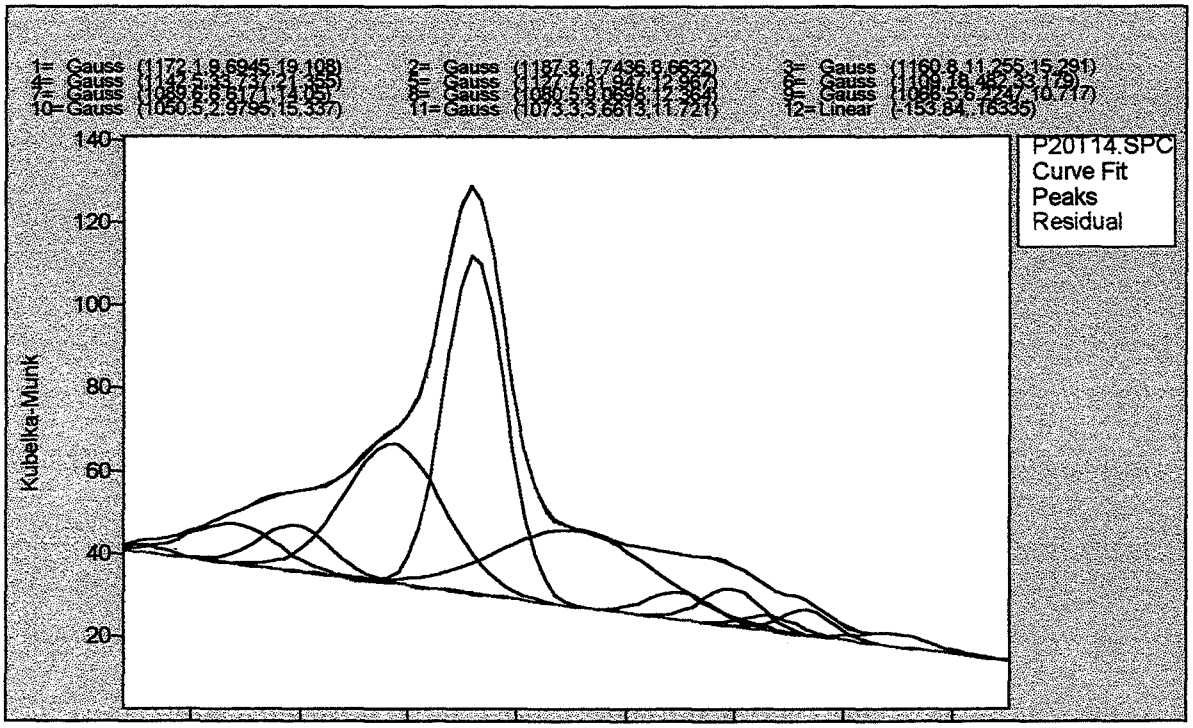


figure 24 : homme 17 ans

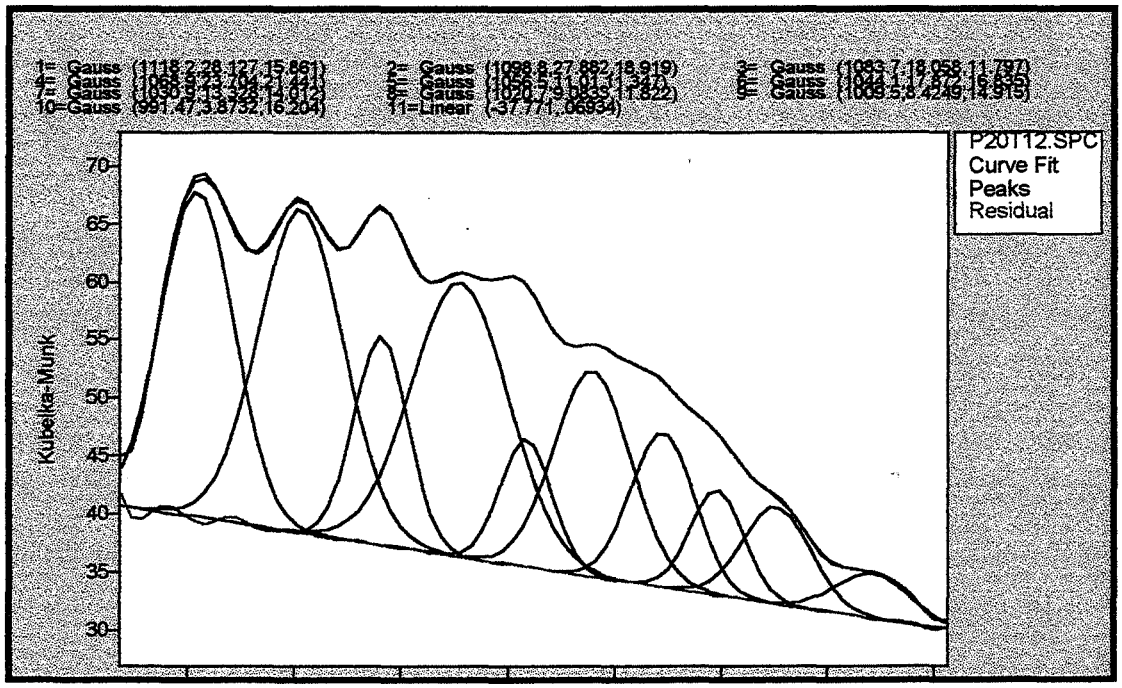


figure 25 : homme 40 ans

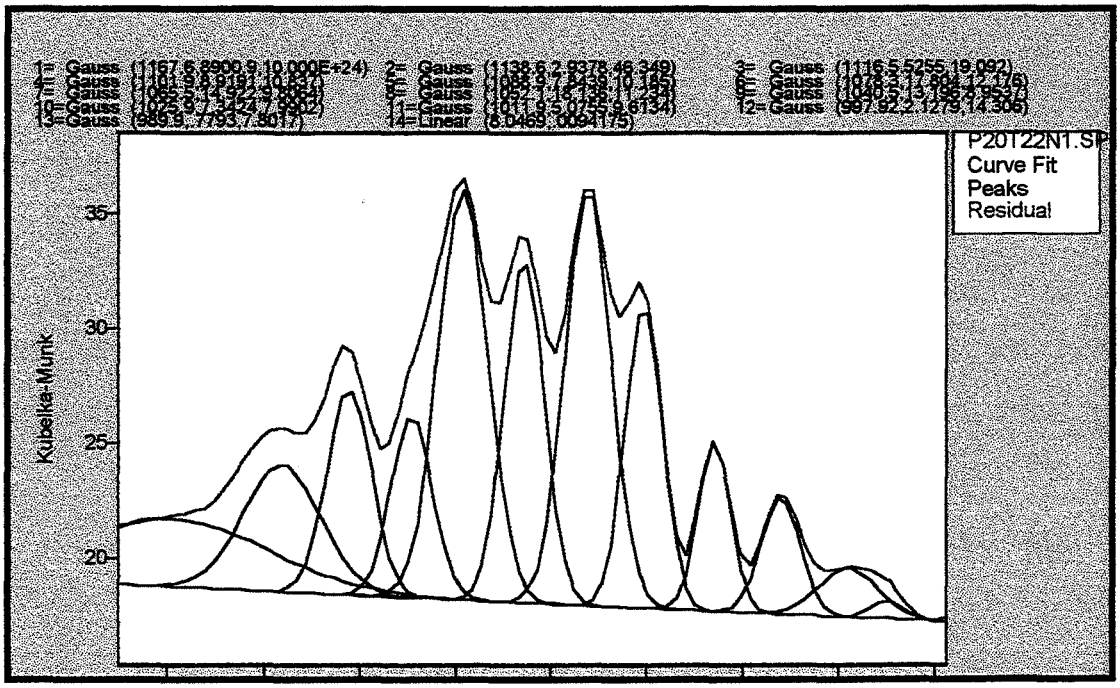


figure 26 : homme 56 ans

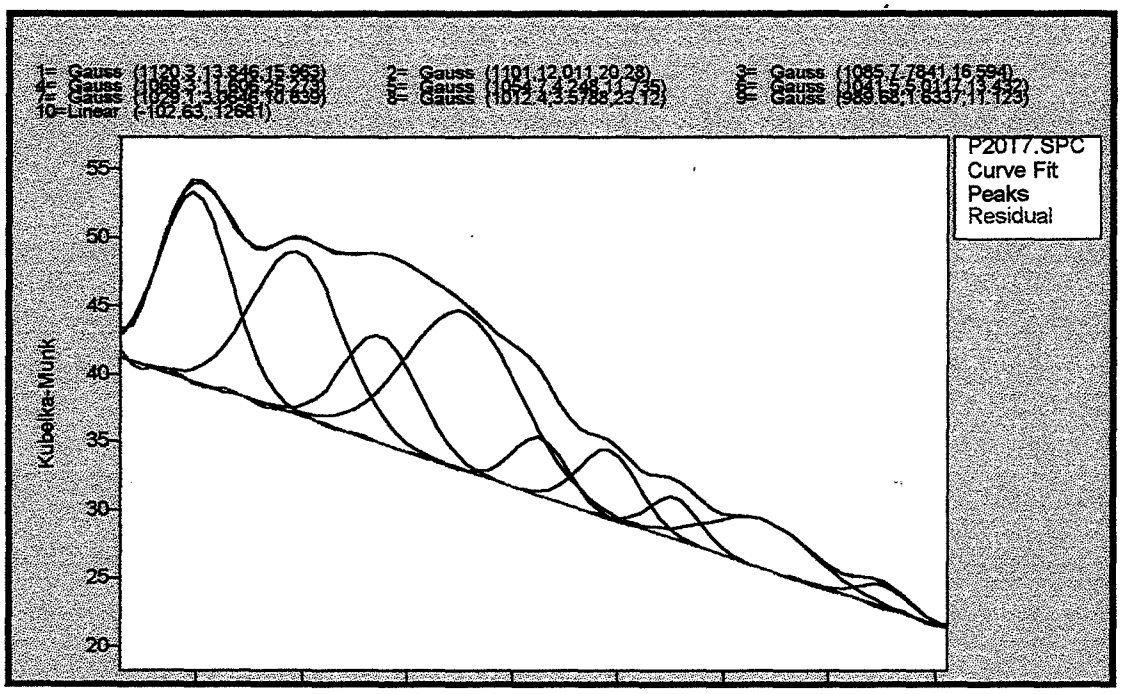


figure 27 : femme 30 ans

Ces figures nécessitent quelques commentaires :

- ➡ La désommation ne fait pas apparaitre le même nombre de bandes suivant les témoins : peu de bandes chez le témoin de 17 ans.
- ➡ Les formes de bandes sont différentes suivant les témoins.

L'observation plus approfondie nous permet de penser que la *phase non apatitique* très fortement présente chez le sujet de 17 ans *"masque"* vraisemblablement d'autres bandes que le traitement mathématique imposé ne peut pas mettre en évidence. Il *serait grave* de faire un autre traitement sans tenir compte des caractéristiques de la courbe expérimentale (voir partie II paragraphe 2-1-2-2). Au fur et à mesure que *la phase non apatitique* devient moins importante les bandes des différentes phases apparaissent et se dégagent de cette très forte absorption.

Malgré les valeurs que nous donne le logiciel des mesures des hauteurs ou des calculs des aires des pics pendant les traitements mathématiques, nous nous garderons bien d'effectuer le moindre calcul pour les raisons suivantes :

➡ L'acquisition en réflexion diffuse *rend difficile une quantification* car un même produit ne donnera pas une bonne reproductibilité sur la hauteur d'une bande d'absorption. Prenons l'exemple d'une poudre, le remplissage de la cellule est différent d'une manipulation à l'autre ainsi que la population des grains soumis à la radiation incidente. En effet, pour éviter toute réflexion spéculaire on érase la surface, sans tassement, avec l'arête d'une spatule. Les grains offrent donc une surface différente à chaque acquisition. L'étalonnage devient alors délicat et en conséquence la quantification. Lorsque l'on opère sur des échantillons massifs, comme c'est le cas dans ce travail, la surface spécifique du matériau est un paramètre important.

➡ Dans le cas d'un matériau comme l'os, on n'est jamais certain qu'une bande, soumise à l'analyse quantitative n'en cache pas une autre non identifiée. En effet, on ne connait pas encore toutes les phases et/ou tous les composés qui sont présents sur un type donné d'échantillon. La fluctuation du rapport de ces phases entre elles est aussi inconnue.

2-8-3. TABLEAUX RECAPITULATIFS DE CES TRAITEMENTS

Les tableaux qui suivent représentent les différentes bandes d'absorption obtenues pour les témoins avec les traitements de désommations.

Les zones observées 1200 - 800 cm^{-1} et 650 - 400 cm^{-1} sont déconvoluées avec les paramètres suivants : HW = 20 ; F = 2 . BESSEL.

Les spectres déconvolués sont ensuite soumis au traitement de désommation Seules les bandes apparaissant avec la déconvolution sont soumises à la désommation.

Les matériaux de référence n'ont pas été soumis au traitement mathématique et les différentes bandes sont simplement relevées à partir des courbes expérimentales ou du tableau 3 page 41.

Ces tableaux mettent en valeur, pour les différents témoins, les principales zones d'absorption que l'on a essayé de comparer avec les références.

Toutefois, certaines bandes, communes à presque tous les sujets ne concernent pas un phosphate de calcium connu. Ces vibrations se situent respectivement à 1156-1161 cm^{-1}, 1130-1120 cm^{-1}, 1100 cm^{-1}, 1066-1070 cm^{-1}, 1012 cm^{-1} , 930 cm^{-1}, 903 cm^{-1}, 895 cm^{-1}, 582 cm^{-1}, 505 cm^{-1}, 495 cm^{-1}, 484 cm^{-1}.

Certaines vibrations *pourraient correpondre* à certaines formes de sulfate de calcium : (MOENKE H *(84, 130)*) dont :

- la vibration ν_1 est répertoriée à 1012 cm^{-1}
- la vibration ν_3 , composite, est répertoriée à 1158, 1120 et 1100 cm^{-1}.

Il est à signaler que certains composés non collagéniques de la matrice sont des composés sulfatés (sulfate de chondroitine etc...) et qu'un complexe avec l'ion calcium n'est pas improbable du tout. *Les vibrations des composés sulfatés, si elles sont présentes, se trouvent dans la région de la large bande ν_3 des phosphates.* Toutefois, des analyses complémentaires sont nécessaires.

Ces tableaux clôturent l'observation du tissu osseux chez les témoins humains.

TABLEAU RECAPITULATIF DES PRINCIPALES BANDES D'ABSORPTION

		HPO4-OH cm-1	cm-1	cm-1	v3 HPO4 cm-1	? cm-1	? cm-1	v3 HPO4 cm-1	? cm-1	v3 HPO4 cm-1	v3 PO4 cm-1	v3 HPO4 cm-1	cm-1
	HAP										**1086**		
	OCP	**1191**			**1140**			**1114**		**1090**		**1080**	
références	**BRUSHITE**							**1113**		**1091**			
	MONETITE	**1196**					**1119**						
	TCP		**1167**								**1085**		
	ages												
	15 ANS		1167			1127		1114	1102		1087		1068
	17 ANS	1188	1163		1144	1128		1106			1084		1070
	18 ANS	1187	1172	1161	1140	1125			1102	1089		1079	1067
	22 ANS	1185	1169	1158	1141		1122	1107		1089		1077	1066
	23 ANS	1186	1172	1161	1146	1126			1103			1079	1068
	23 ANS	1188	1171	1160	1147		1120	1107			1087		1071
	24 ANS		1164		1145	1128			1102	1091		1079	1065
	29 ANS	1186	1173	1159	épaulement	1125		1106		1091			1070
	36 ANS		1170		1151	1124		1107			1083		1071
hommes	**40 ANS**	1184	1170	1159	1142		1117		1099		1084		1069
	43 ANS	1186	1170	1157	1143	1130		1106		1089			1070
	43 ANS		1166	1154	1142	1127		1114		1090			1071
	43 ANS	1189	1171	1160	1145		1118		1101	1089			1076
	44 ANS		1169	1157	1144		1121		1102		1085		1067
	47 ANS		1170	1158		1124		1114	1103		1085		1067
	47 ANS	1185	1170	1156			1120		1104		1083		1072
	47 ANS	1186	1168	1150		1127		1111	1100		1083		1071
	49 ANS		1171	1154	1140		1122	1114	1102			1078	1067
	52 ANS	1185	1171	1158		1125			1102		1086	1079	1066
	56 ANS	1185	1172	1159	1143			1116	1103			1079	1066
	30 ANS	1186	1169	1160	1142		1120		1101	1089		1076	1061
	33 ANS	1185	1170	1159	1141		1119		1105	1090	1081		1069
femmes	**45 ANS**		1170	1157	1142		1120			1096	1084		
	55 ANS		1171		1144		1119		1103	1094		1077	1062
	71 ANS	1184	1168		1142		1118			1090	1087		1063
	74 ANS	1184	1170	1157		1124		1113	1100		1083		1067

TABLEAU RECAPITULATIF DES PRINCIPALES BANDES D'ABSORPTION

ETALONS	v3 PO4 cm-1	v3 PO4 cm-1	v3 PO4 cm-1	v3 PO4 cm-1	cm-1	v2 HPO4 cm-1	v2 HPO4 cm-1	v1 PO4 cm-1	cm-1	HPO4 (P-OH) cm-1	cm-1	cm-1	cm-1
HAP		**1047**						**962**					
OCP	**1052**		**1037**	**1024**				**962**			**911**		
BRUSHITE		**1047**				**1007**	**985**						
MONETITE					**1011**					**916**			
TCP	**1054**				**1012**			**962**					
ages													
15 ANS	1054		1041	1025	1012	1000	985	962		918			
17 ANS	1052					1000	989	963		918			
18 ANS	1054		1041	1024		1006	985	969	959		910		
22 ANS	1054		1042	1025	1011		985	961		918	910		
23 ANS	1053		1041	1025	1011	1000	988	963		917	910 sh ?	903	895
23 ANS	1054		1044	1030	1014	998	983	962	933	926	914 sh		897
24 ANS	1050			1030	1018	1004	992	961	937	920		901	
29 ANS	1054			1025			989	963	931	917	908		
36 ANS	1059	1044		1030	1012	999	985	962	931	920	911		897
40 ANS	1060	1044	1035	1024	1012	996		963	934	920	912		894
43 ANS	1054		1040			1005	988	963	930	917			898
43 ANS	1053	1042		1025	1010	1003	990	962	931	920	907		897
43 ANS		1047	1035	1024		1007	991	960	936	916			
44 ANS		1047		1027	1012		991	962	933	920	903		896
47 ANS	1054		1033		1015	996		961	933	920			896
47 ANS		1048	1037	1026	1013	995		962	930	918			895
47 ANS	1052				1004	992		962	931	918			895
49 ANS	1052	1042		1026	1012	1006	990	963	932	918			895
52 ANS		1043	1032		1013	996		961	933	921			895
56 ANS	1052	1042		1026	1012	997		961	933	919	904		896
30 ANS		1044	1030		1017	996		963	932	919			894
33 ANS	1056	1044	1028		1016	1000	990	961	933	918	909		896
45 ANS	1050					997	986	961	932	917			897
55 ANS		1047	1040	1027	1014		989	964	933	919	907		895
71 ANS			1038		1013		993	963	933	920			894
74 ANS	1052			1027	1010		990	963	930		914		894

TABLEAU RECAPITULATIF DES PRINCIPALES BANDES D'ABSORPTION

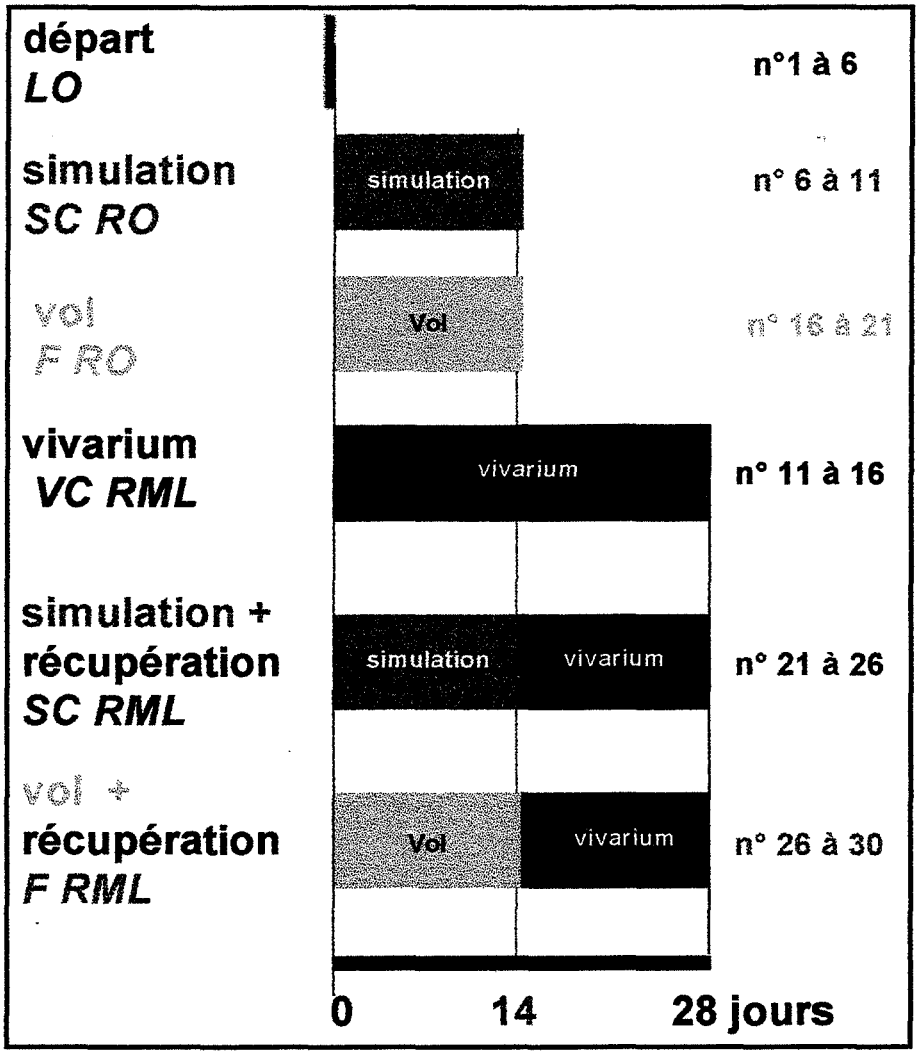
ETALONS	HPO4 P-OH cm-1	cm-1	cm-1	cm-1	cm-1	cm-1	OH LIB. cm-1	cm-1	cm-1	v4 PO4 cm-1	cm-1	cm-1	v4 PO4 cm-1
HAP							**630**			**599**			**570**
OCP	**871**						**630**			**600**			**574**
BRUSHITE		**863**		**811**	**651**					**596**			
MONETITE									**610**				**575**
TCP	**873**		**836**			**645**		**619**			**588**		
ages													
15 ANS	875			813	654	645	632	620		600	589	582	574
17 ANS	880			813	655	648		621			587		574
18 ANS	875		835	811	655	643	633	620		600	588		574
22 ANS	875			813	655	643	631	617				582	571
23 ANS	881	866	835	812	655	649		620			587		573
23 ANS	877		835	815									
24 ANS	875		839	814	655	642		624	615	592		583	578
29 ANS	881	867	832	815	655	648	631	620			587		572
36 ANS	875	858	830	812	655	649		619				584	572
40 ANS	877		832		656	649	634	617	607		586	576	569
43 ANS	877		827	813									
43 ANS	875	857	836	812	655	649	630	623			588		571
43 ANS	878		830	813		649	630	617	609	597	586	578	573
44 ANS	876	869	831	813	655	649		621	610		589	581	570
47 ANS	875		828	812	654	641	625	617	610		593	582	567
47 ANS	876		828	812	655	649	632	618			591	583	566
47 ANS	877		831	812	655	649	633	620			589	584	572
49 ANS	880	865	831	813	649	642	633	616		602	593	584	572
52 ANS	877		831	814	654	642	627	619		598	588	579	568
56 ANS	878		836	809	656	648	635	615	607	600			568
30 ANS	875		831	812	655	649	633	619			590	580	
33 ANS	876		830	814	655	650	630	617		594		581	568
45 ANS	876		829	814	654	645	633	622			585		573
55 ANS	877		833	812	657	649	630	616	606		592	579	566
71 ANS	877		830	812	649	642	633	616	609		590	580	571
74 ANS	878		827	810	655	647	626	615			584		571

TABLEAU RECAPITULATIF DES PRINCIPALES BANDES D'ABSORPTION

ETALONS	v4 PO4 cm-1	cm-1	cm-1	v4 PO4 cm-1	cm-1	cm-1	cm-1	cm-1	v2 PO4 cm-1	cm-1	v2 PO4 cm-1
HAP									**473**		**459**
OCP	**561**			**531**					**472**		
BRUSHITE											
MONETITE			**544**		**516**				**476**		
TCP		**552**								**468**	
ages											
15 ANS				537	518				471		459
17 ANS			544	536	515				472		
18 ANS			544	534					472		460
22 ANS			548	536					472		
23 ANS			546	527	518	505		485	473		456
23 ANS											
24 ANS	565	550	540		520			484	471		
29 ANS			547	526	517	503		484	471		458
36 ANS		555	545	526	517	503		484	472		457
40 ANS		549	536	527	518	504		484	475		458
43 ANS											
43 ANS		547	536	525	516	506		481	472		457
43 ANS	561	543	533		522	509		488		467	
44 ANS		544	536	526	518	502		490	471		461
47 ANS		552	538	528	519	506		484	474		458
47 ANS		548	537	527	517	501		487	476		458
47 ANS		546	535	527	517	502		483	472		458
49 ANS	556	549	537	527	520	509		484	475		463
52 ANS		549	538	525	519	506		485	475		461
56 ANS			541	527	520	502		484	473		457
30 ANS		548	538	529	520	508		481	474		458
33 ANS		548	538	527	519	508		486	472	463	
45 ANS		550	538	525	516	503		483	472		452
55 ANS		544		528	519	508		486	474	461	
71 ANS		547		528	519	512	495	486	471	460	448
74 ANS		546	536	528	518	510	496	485	479	460	448

3-1. L'EXPERIMENTATION EN MICROGRAVITE

Pour une meilleure compréhension des résultats, nous présentons à nouveau le tableau exprimant la dénomination des différents groupes tels qu'ils ont été définis par la NASA lors de la: MISSION STS 58, SPACELAB -2. (chapitre I page 24).



La série LO : rats sacrifiés au temps zéro (lancement de la fusée)
La série SCRO : rats sacrifiés au bout de 14 jours (ayant subi une simulation de vol)
La série FRO : rats sacrifiés au bout de 14 jours (ayant participé au vol spatial)
La série VCRML : rats sacrifiés au bout de 28 jours (issus du vivarium)
La série SCRML : rats sacrifiés au bout de 28 jours (14 jours de simulation et 14 jours de vivarium)
La série FRML : rats sacrifiés au bout de 28 jours (14 jours de vol spatial et 14 jours de vivarium)

3-1-1. REFLEXION DIFFUSE - ACQUISITION DIRECTE -

3-1-1-1. L'os trabéculaire

Les **figures 30, 31, 32, 33, 34 et 35** se rapportent respectivement aux spectres des séries LO, SCRO, FRO, VCRML, SCRML et FRML.

Aucun rat du groupe VCRO n'est arrivé en France. Ce groupe est important. car les rats ont séjourné en vivarium pendant la durée de de la mission spatiale et de ce fait sont des *témoins* d'une part des rats ayant subi une simulation (SC RO) et d'autre part des rats ayant participé au vol spatial (F RO), *sans temps de récupération.*

temps zéro (lancement de la fusée)

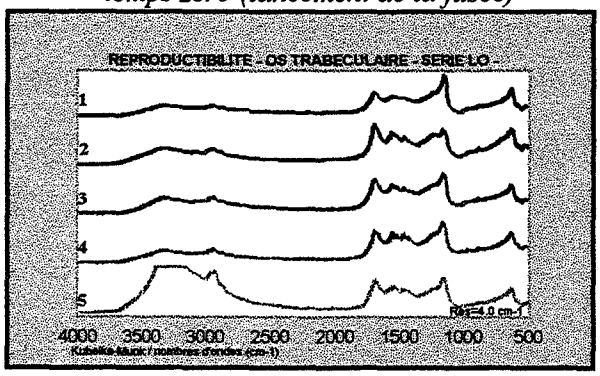


figure 30

14 jours (ayant subi une simulation de vol)

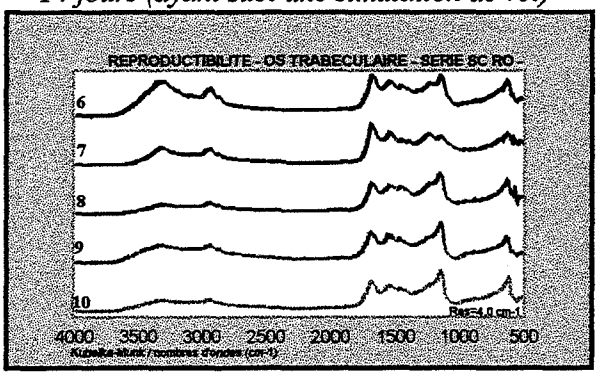


figure 31

Dans la série LO (rats sacrifiés au départ) (**figure 30**) le n°5 présente une très forte absorption vers 3600-2800 cm^{-1} qui concerne les vibrations OH, N-H et C-H.

La bande centrée vers 1127 cm^{-1} est vraisemblablement lié au problème de croissance des rats puisque cette bande concerne les phases non apatitiques. Chez l'homme, elle s'atténue fortement avec l'âge.

Dans la série SCRO (**figure 31**), mis à part le n° 7 (bande non apatitique moins importante) les spectres sont très rapprochants. On remarque sur les N° 7 et 8 la présence d'artéfacts vers 550 cm^{-1}. Le n° 6 semble avoir un taux d'hydratation plus important que les autres.

14 jours (ayant participé au vol spatial)

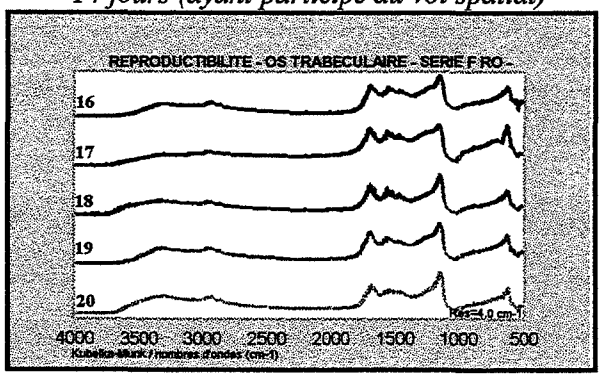


figure 32

28 jours (issus du vivarium)

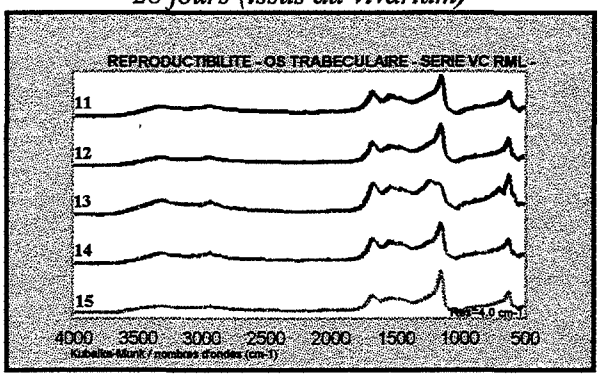


figure 33

Dans la série FRO (**figure 32**), les spectres ne présentent pas "visuellement" des différences significatives. Ils montrent tous un environnement non-apatitique important.

Dans les autres series RML (VCRML, SCRML et FRML) (**figure 33, 34 et 35**) nous pouvons faire les mêmes remarques.

28 jours (14 j. de simul.+ 14 j. de vivarium)

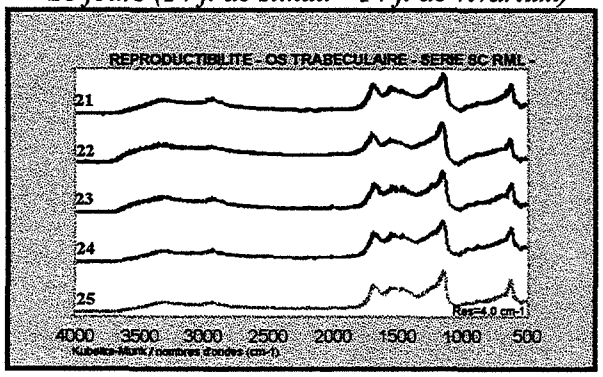


figure 34

28 jours (14 j. de vol spatial + 14 j. de vivarium)

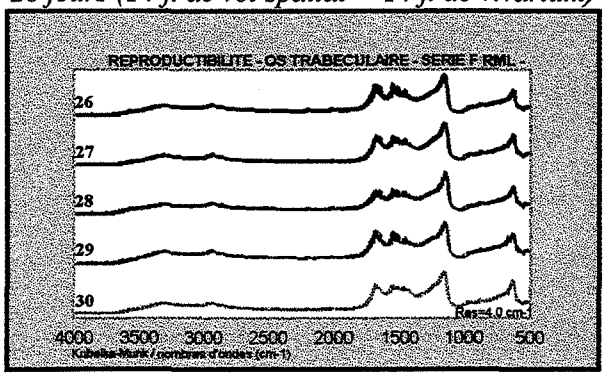


figure 35

En conclusion, les spectres infrarouges de l'os trabéculaire ne peuvent pas mettre en évidence des différences significatives pour les raisons suivantes :

1) La région des phosphates située vers 1100 cm-1 est masquée par la bande trop importante de l'environnement non apatitique qui ne permet plus l'observation de différences (si elles existent) des divers précurseurs de l'apatite.

2) l'environnement non-apatitique est commun à tous les groupes. Cet environnement est certainement dû au fait que les rats sont en période de croissance.

Il est toujours difficile d'observer de faibles différences sur deux fortes valeurs et de ce fait, l'altération dans la croissance (si elle existe dans l'os trabéculaire) n'a pas pu être mise en évidence par cette méthode.

3) l'importance de cet environnement interdit tout traitement mathématique tel que la déconvolution.

3-1-1-2. l'os cortical

Les **figures 36, 37, 38, 39, 40 et 41** se rapportent respectivement aux spectres des séries LO, SCRO, FRO, VCRML, SCRML et FRML.

temps zéro (lancement de la fusée)

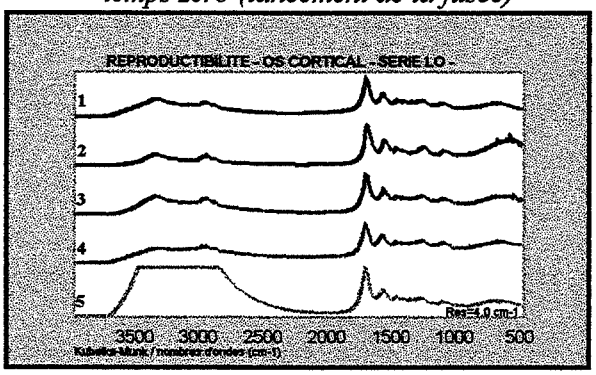


figure 36

14 jours (ayant subi une simulation de vol)

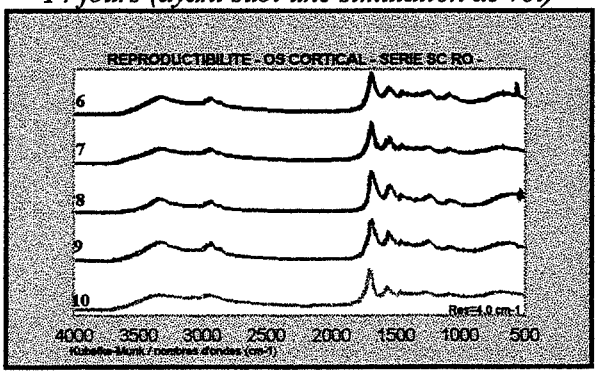


figure 37

14 jours (ayant participé au vol spatial)

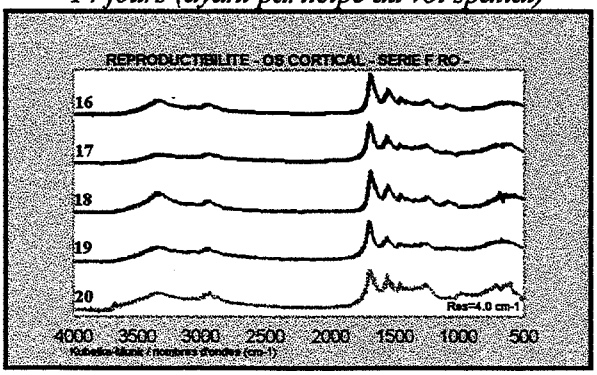


figure 38

28 jours (issus du vivarium)

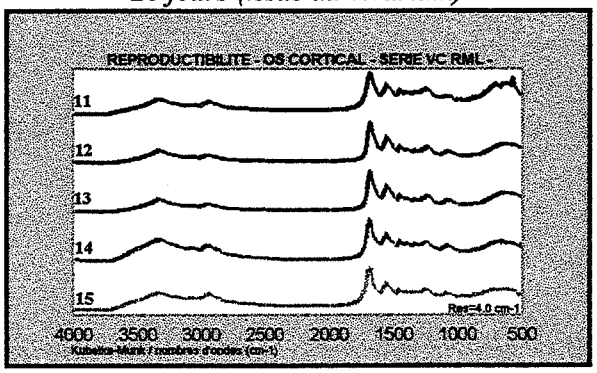


figure 39

28 jours (14 j. de simul. + 14 j. de vivarium)

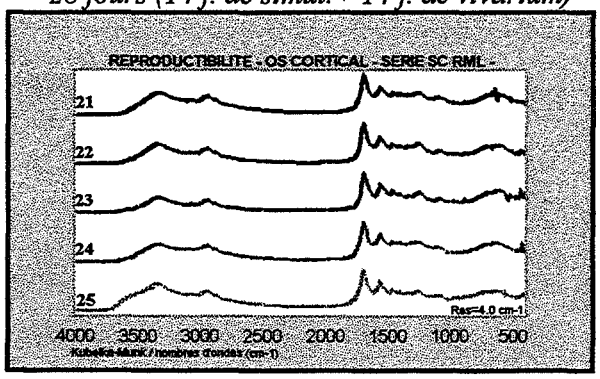


figure 40

28 jours (14 j. de vol spatial + 14 j. de vivarium)

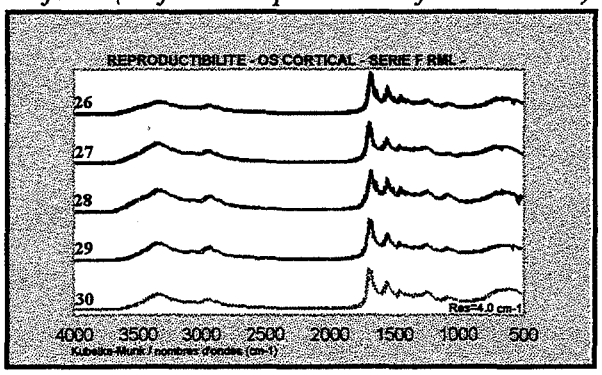


figure 41

Les spectres de l'os cortical, pour tous les groupes, montrent une très nette différence avec les spectres de l'os trabéculaire (figure 30 à 35).

3-1-1-3. L'os trabéculaire et l'os cortical

La figure 42 concerne l'os d'un rat (n° 12) du *vivarium control* série VCRML. Cette figure met en évidence des différences entre l'os trabéculaire et l'os cortical.

28 jours (issus du vivarium)

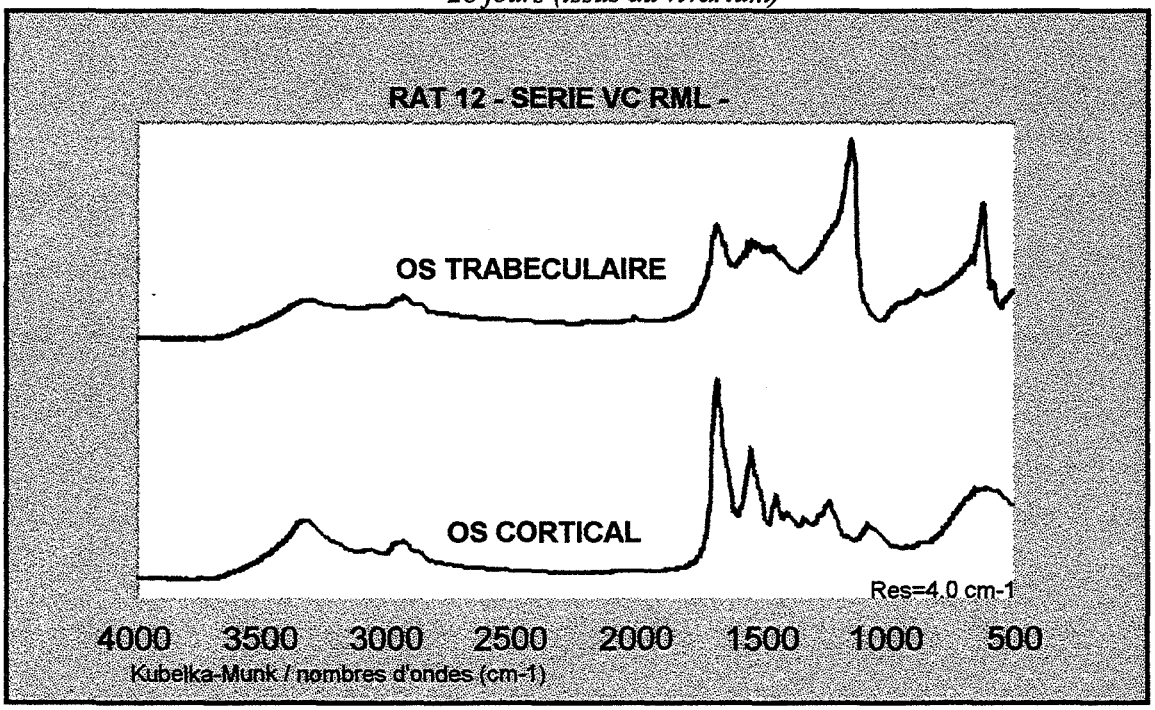


figure 42

Il peut sembler surprenant que l'os cortical, plus minéralisé que l'os trabéculaire, ait des bandes d'absorption importantes dans la région des liaisons des groupements C=O et N-H (1650-1500 cm^{-1}). Il paraitrait donc plus rationnel de tracer ce spectre en minimisant la forte absorption de ces groupements pour l'os cortical, mais la bande dans la région des phosphates (1200-1000 cm^{-1} et vers 600 cm^{-1}) diminuerait aussi. Il est donc possible que la forte absorption dans la région des phosphates pour l'os trabéculaire ne soit pas *totalement* de même nature que celle de l'os cortical. Les bandes de vibration de valence symétriques et antisymétriques des groupements CH_3 et CH_2 situés vers 2800-3000 cm^{-1} apparaissent approximativement égales sur le tracé et mettent ainsi en évidence la contribution de la matière organique. Il est évident que pour l'os cortical, plus minéralisé, cette contribution est surestimée.

On remarque aussi chez l'os trabéculaire une très forte absorption centrée sur 630 cm^{-1} qui est généralement la vibration des groupements O-H des apatites (libration) mais compte tenu de l'importance de ce massif (plusieurs bandes d'origine différentes?) on ne peut tirer aucune conclusion sur l'origine de ce massif.

En conclusion, des complexes organo-métalliques (non identifiés) sont très certainement présents. Ils sont responsables de l'absorption dans la région des amides (1700-1500 cm^{-1}) et dans la région des phosphates (1200-1000 cm^{-1} et vers 600 cm^{-1}). Cette conclusion est en accord avec les travaux de SAUER ET WUTHIER (93). Ces auteurs avaient remarqué que toutes les bandes d'absorption des spectres infrarouges étaient exaltés lors du processus *in vitro* de minéralisation dans des vésicules. Ils avaient conclu à la présence de complexes.

Contrairement à l'os trabéculaire, les spectres relatifs à l'os cortical seront déconvolués pour essayer de mettre en évidence des différences éventuelles entre les groupes.

3-1-2. LES DECONVOLUTIONS - OS CORTICAL -

Les déconvolutions concernent la région 1200-800 cm^{-1}. Elles sont effectuées à l'aide de la station DIGILAB 3200 avec les paramètres suivants f = 2 ; bessel ; HW = 20. Les courbes sont tracées à l'aide du logiciel GRAMS de GALACTIC.

temps zéro (lancement de la fusée)

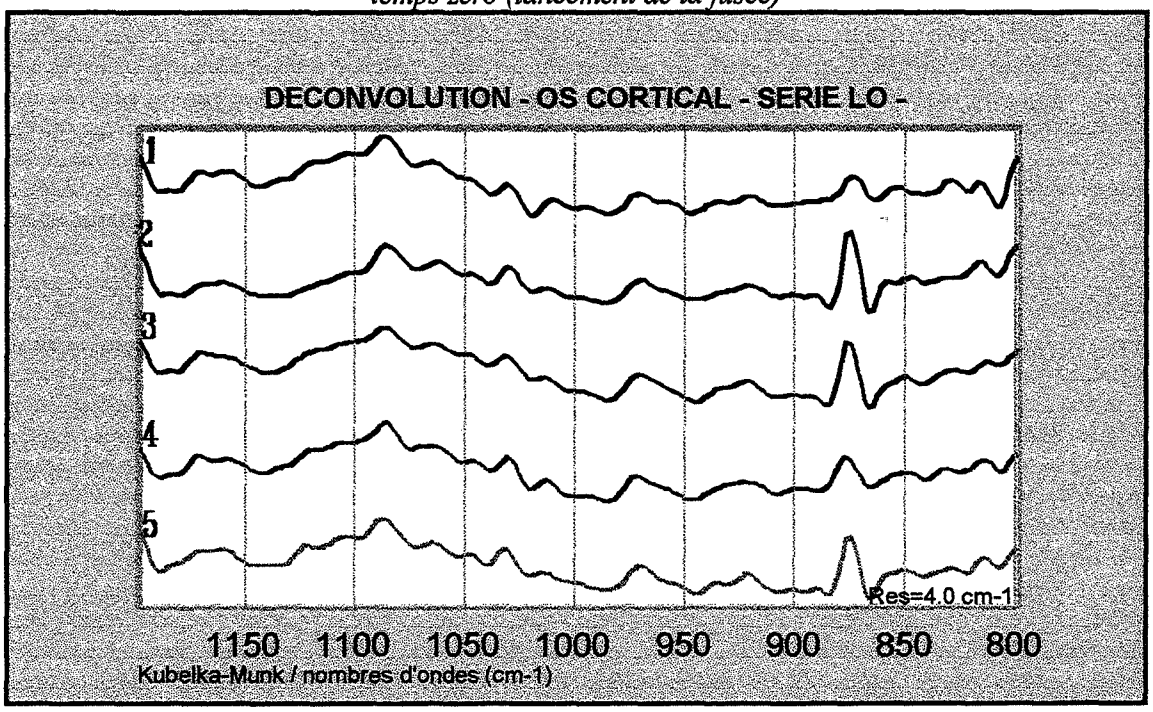


figure 43

La figure 43 présente les spectres déconvolués des cinq rats du groupe LO (sacrifiés au départ de la mission). Ces spectres se ressemblent fortement mis à part la bande vers 875 cm^{-1}, bande composite des carbonates et des hydrogénophosphates.

Ces rats sont les plus jeunes des rats examinés et la croissance peut être un facteur relativement important.

La figure 44 présente les spectres déconvolués des cinq rats du groupe SC RO (rats sacrifiés au bout de 14 jours, n'ayant pas volé mais ayant subi un contrôle de simulation). Les spectres infrarouges des différents individus de ce groupe sont très ressemblants entre eux. Les absorptions dans les différents domaines (carbonates et phosphates) sont reproductibles.

La figure 45 est relative aux rats du groupe VC RML (rats sacrifiés au bout de 28 jours et n'ayant subi ni vol ni simulation). Les différents individus à l'intérieur de ce groupe semblent très homogènes bien que le rat 11 semble montrer une très légère différence. La bande vers 875 cm^{-1} semble particulièrement stable à l'intérieur de ce groupe.

14 jours (ayant subi une simulation de vol

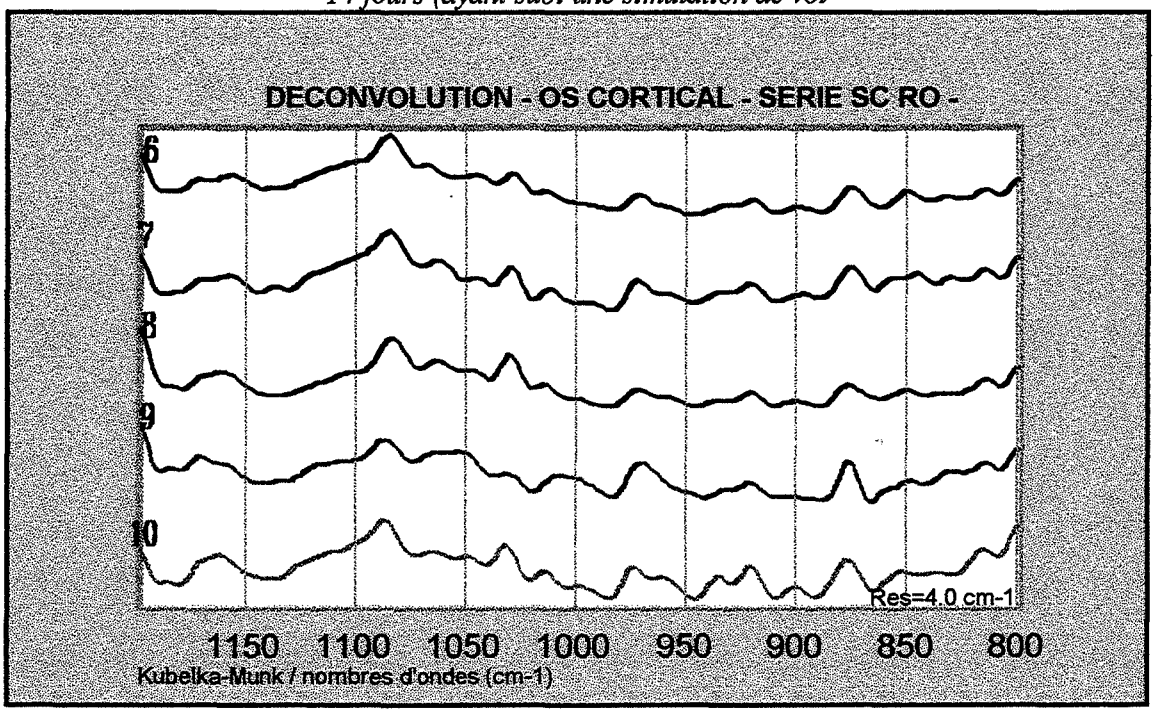


figure 44

28 jours (issus du vivarium)

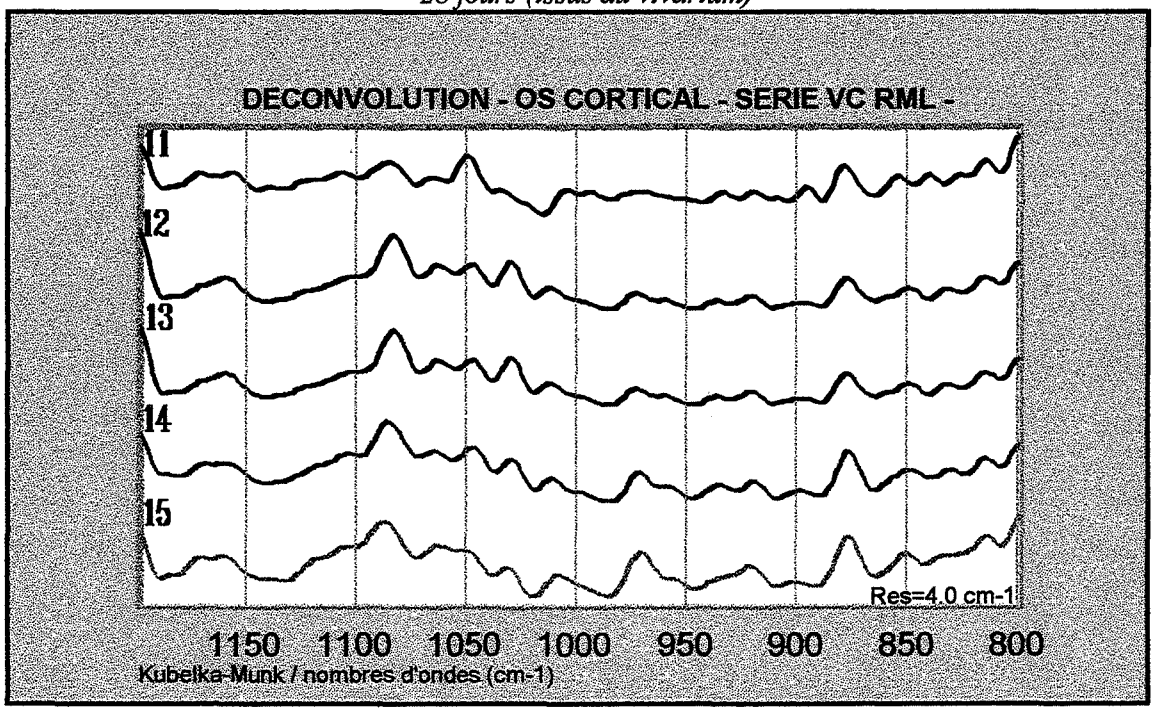


figure 45

14 jours (ayant participé au vol spatial)

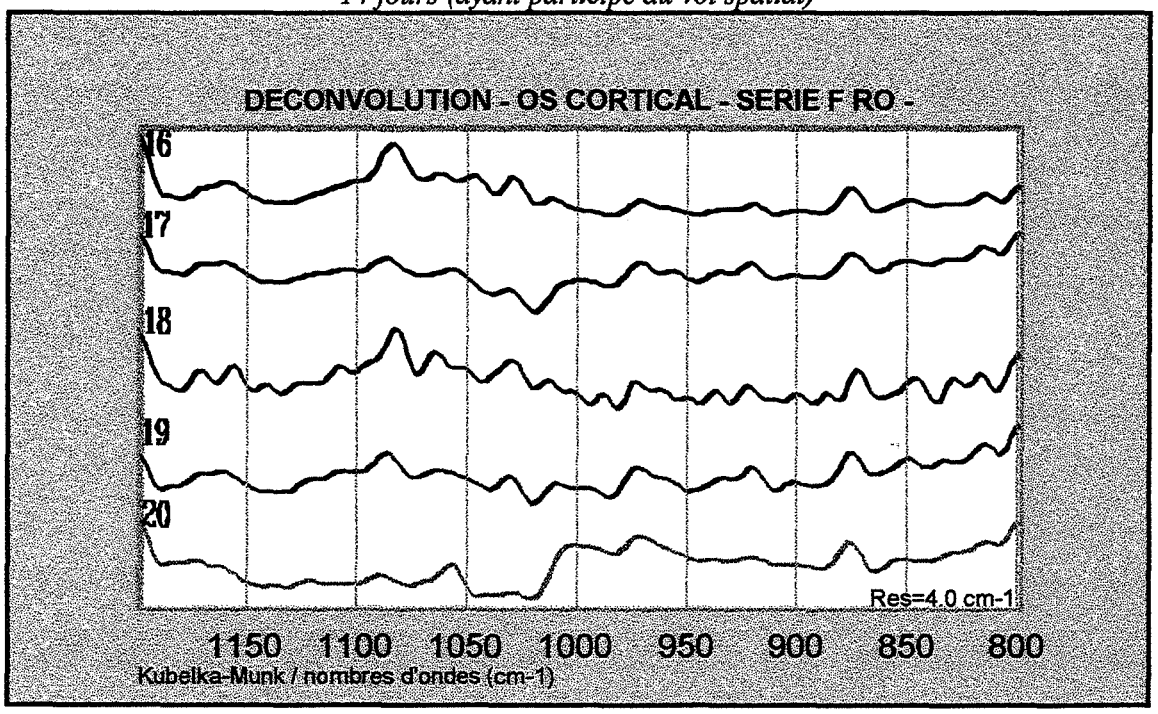


figure 46

La figure 46 est relative aux cinq rats du groupe F RO (rats ayant subi le vol spatial et sacrifiés au retour). La déconvolution montre une hétérogénéité entre les individus ayant subi le vol spatial. Par contre la vibration à 875 cm^{-1} (bande composite des carbonates) est relativement stable. Compte tenu, que nous ne connaissons pas le rapport : partie purement minérale/complexe organo-métallique interférant dans cette région, il est impossible de donner des conclusions très précises sur l'effet de l'apesanteur sur tel ou tel composé.

La non-répétabilité de ces spectres nous permet de penser que pour certains individus de ce groupe il y a eu des modifications, lors du vol spatial, dans la structure du minéral et/ou dans des complexes organo-métalliques.

La figure 47 concerne le groupe SC RML (rats ayant subi une simulation pendant 14 jours puis ayant séjourné dans un vivarium pour récupérer pendant 14 jours). Contrairement au groupe SC RO (figure 44), dont les rats ont subi la même simulation mais qui ont été sacrifiés au bout de 14 jours, on observe des différences importantes dans la bande à 875 cm^{-1} en particulier pour le numéro 23. De plus, les spectres déconvolués sont beaucoup moins reproductibles entre les individus que pour le groupe SC RO. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce phénomène :

1) Le sacrifice au bout de 14 jours après la simulation était prématuré pour s'apercevoir d'un changement. En effet, il est admis que l'os trabéculaire répond en premier aux phénomènes de stress contrairement à l'os cortical.

2) Le sacrifice au bout de 28 jours met en évidence *peut-être* d'une part l'altération subie lors de la simulation et d'autre part la récupération c'est à dire un *remaniement* éventuel.

28 jours (14 j. de simul. + 14 j. de vivarium)

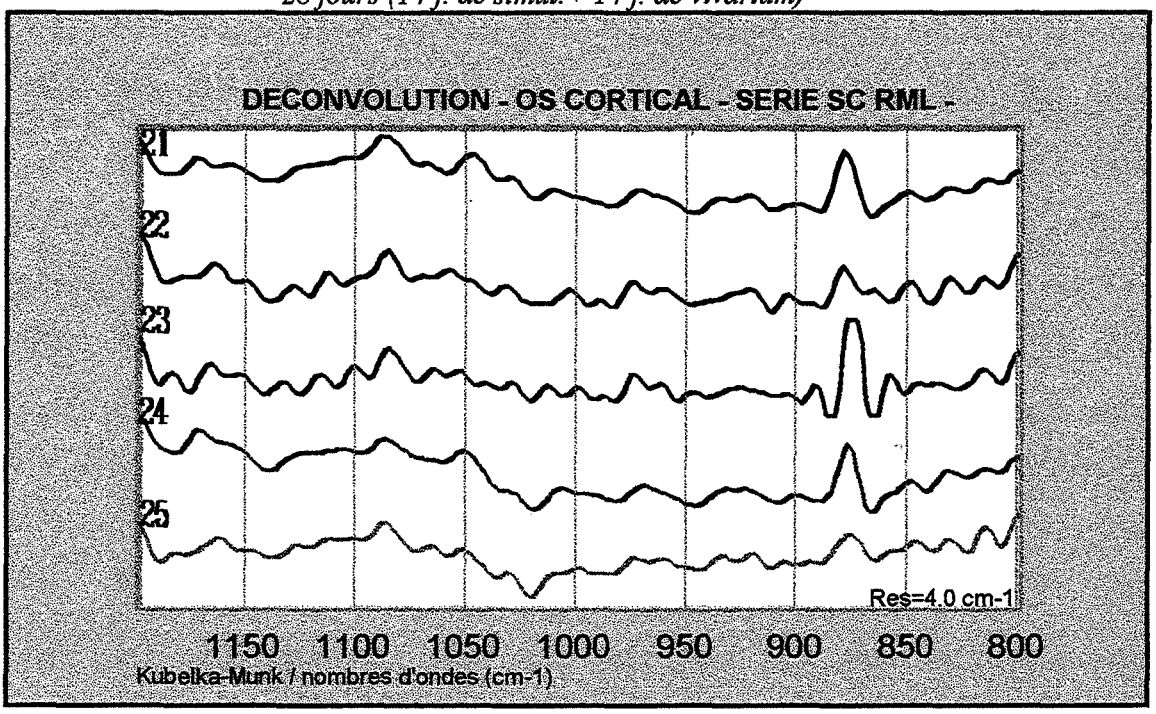


figure 47

28 jours (14 j. de vol spatial + 14 j. de vivarium)

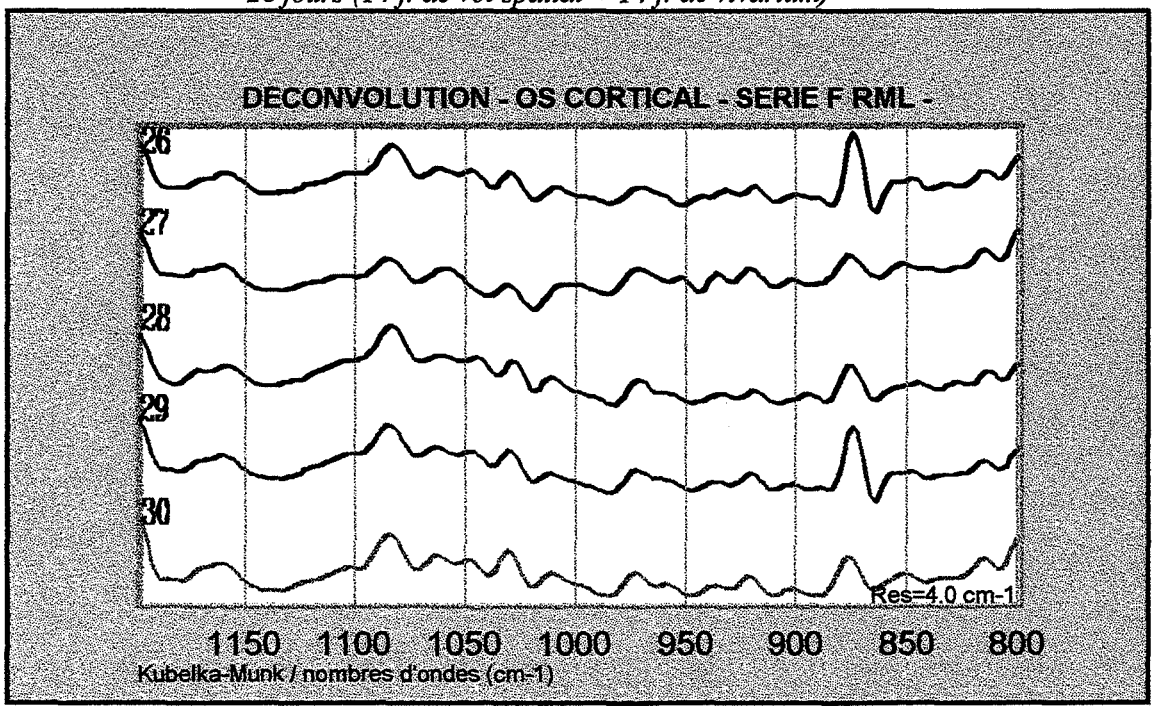


figure 48

La figure 48 concerne le groupe F RML (rats ayant paricipé au vol spatial puis ayant séjourné dans un vivarium pour récupérer pendant 14 jours). Contrairement au groupe F RO (figure 46), dont les rats ont participé au vol et qui ont été sacrifiés à l'atterrissage, on observe une bonne reproductibilité dans les spectres déconvolués de tous les individus sauf pour la bande à 875 cm^{-1} qui semble beaucoup fluctuée. On pourrait penser que cette bande composite (carbonate + hydrogénophospate) est le signe d'un remaniement dans le minéral. En effet, la présence d'hydrogénophosphate est surtout observée lorsque le minéral est jeune et tend à disparaitre avec la maturité du minéral.

Cette bande est intéressante à observer et mérite une étude complémentaire.

En conclusion de cette étude, nous remarquons :

1) Seuls les rats ayant participé au vol spatial présentent des anomalies caractéristiques, chez certains individus du groupe, au bout de 14 jours. La récupération en vivarium, équivalent au temps de vol (14 jours), semble montrer un retour à la normale avec peut-être un minéral plus jeune (présence d'hydrogénophosphate?).

2) Les rats ayant subi une simulation ne présentent pas d'anomalie caractéristique au bout de 14 jours mais seulement après le temps de récupération.

3-2. ESSAIS DE NORMALISATIONS DES SPECTRES

3-2-1. LA REGION 1200 - 800 cm^{-1}

28 jours (14 j. de vol spatial + 14 j. de vivarium)

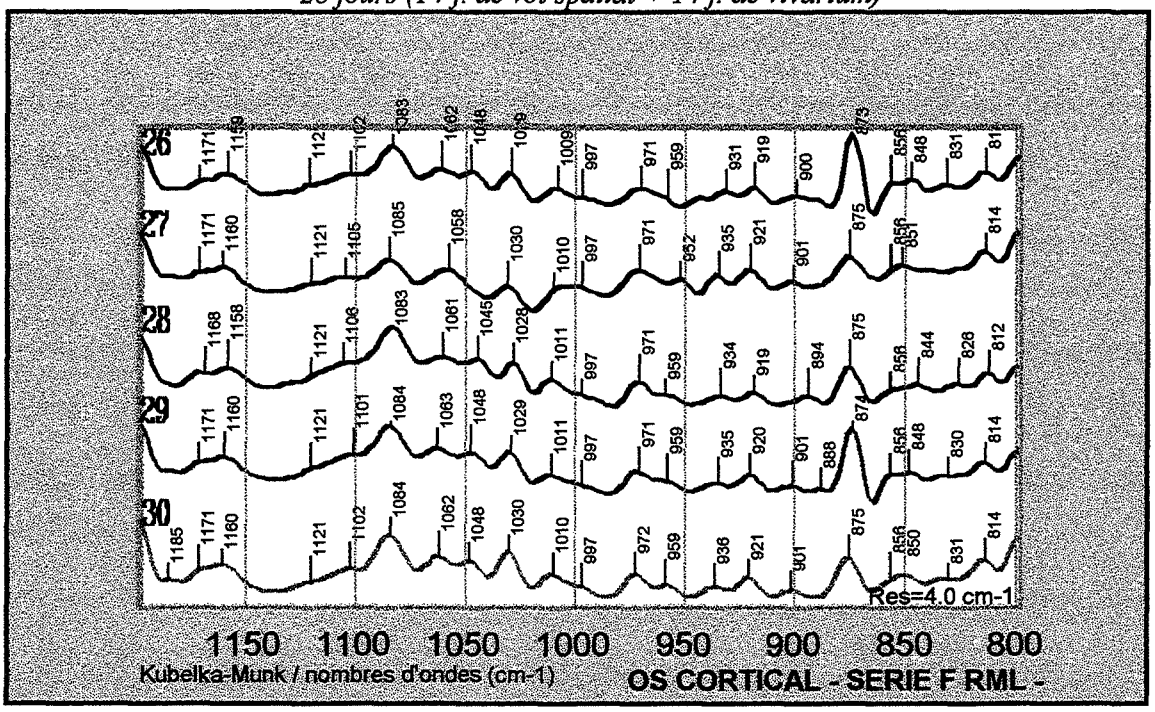


figure 49

La figure 49 est identique à la figure 48 mais avec les pics indicés dans la région de la déconvolution.

Ces spectres sont très difficiles à comparer les uns aux autres d'une manière quantitative. Des précautions sont nécessaires pour aborder la quantification.:

1) L'acquisition en réflexion diffuse, contrairement à l'acquisition en mode de transmission, se prête très mal à la quantification. L'acquisition en transmission, dans le but d'une quantification est souvent effectuée sur une pastille d'un mélange (généralement 1/300) avec du bromure de potassium pesé exactement pour que la pastille, la compression terminée, présente toujours la même épaisseur ce qui permet, si le mélange est bien homogène, d'appliquer la loi de Beer-Lambert.

2) Une référence *au moins* est généralement nécessaire si l'on admet l'origine à zéro..

3) Pour quantifier un spectre, il est impératif d'avoir au moins *une* bande stable, non soumise au déplacement, non composite, connue et commune à tous les spectres. Dans ce cas là on peut effectuer des calculs, comme en diffraction RX, par rapport à cette bande.

Les difficultés pour la quantification avec les spectres infrarouges présentés dans ce travail sont dues en partie par :

1) la volonté de ne pas altérer l'échantillon soit par déminéralisation, soit par broyage et compression.

2) les bandes qui sont susceptibles de se déplacer légèrement par des effets d'intéraction entre les différents vibrateurs. Ces bandes sont aussi très souvent composites. De plus, on n'est jamais sûr que la fréquence, d'un spectre à l'autre, soit toujours entièrement réservée aux mêmes vibrateurs et qu'une nouvelle vibration n'arrive pas, pour des motifs divers, stériques ou autres, en surimpression avec une fréquence répertoriée.

3) L'ignorance du nombre et de la structure de certains composés. Il est donc impossible de se servir d'un *étalon*.

En dépit de toutes ces raisons nous avons quand même essayé de normaliser les spectres des différents groupes de rats.

Il nous a semblé que, compte tenu des remarques précédentes, il serait préférable de prendre, plutôt qu'une seule bande, à une fréquence définie, l'ensemble de toutes les aires dans une région déterminée (1200-800 cm^{-1} par exemple) et ensuite de faire le rapport de chaque bande avec l'aire totale.

L'aire de chaque bande est exprimée *en pourcentage de l'aire totale* d'une certaine zone du spectre. Une comparaison des pourcentages peut donc s'établir entre d'une part les bandes d'un même spectre et d'autre part les aires pour chaque fréquence des différents spectres examinés.

Le logiciel GRAMS, avec le programme de désommation (*curve-fitting*), nous a permis d'opérer sur les spectres déconvolués auparavant avec la station Unix DIGILAB 3200. Compte tenu de la capacité de mémoire lors de ce traitement, 3 ou 4 étapes de désommation, pour un même spectre, ont été nécessaires afin de déterminer l'aire totale dans la région considérée (1200-800 cm^{-1}). Pour le tracé des courbes, nous avons utilisé le logiciel EXCEL avec un PC 486.

Les figures 50, 51, 52, 53 représentent les fluctuations, calculées à l'intérieur d'une même série, des aires pour des fréquences déterminées. Ces figures concernent les mêmes groupes que les figures 43, 44, 45 et 46. Nous pouvons remarquer que les histogrammes représentent assez bien les reproductibilités (ou non-reproductibilités) déjà observées. En effet, le groupe FRO (figures 46 et 53) montre une certaine dispersion comparativement aux autres groupes qui sont relativement homogènes.

La déconvolution et le calcul font apparaitre une bande caractéristique, centrée sur 1055 cm^{-1} pour les rats qui ont été soumis au vol spatial. Cette bande apparait sur les spectres infrarouges de quatre rats sur cinq de la série F RO **(figure 54)**. Compte tenu de la très grande complexité de tous ces spectres, il serait très hasardeux de lui donner une attribution précise. Elle est peut-être simplement liée à un effet stérique mais elle indique néanmoins un changement dans la structure. (tableau en annexe).

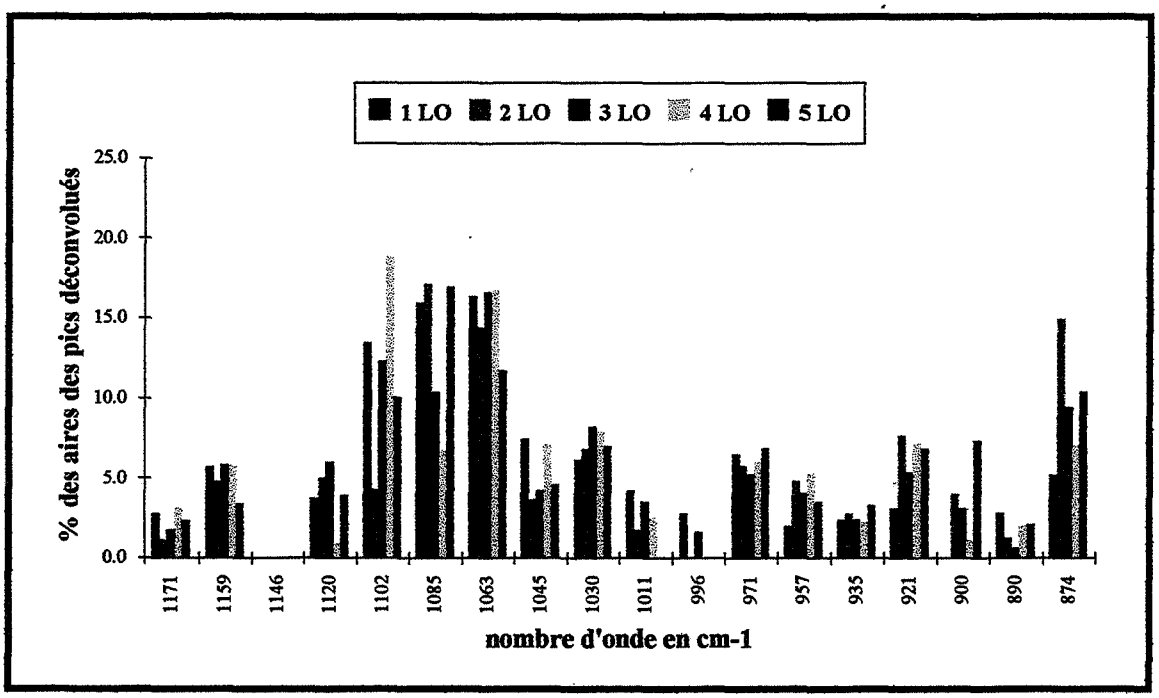


figure 50

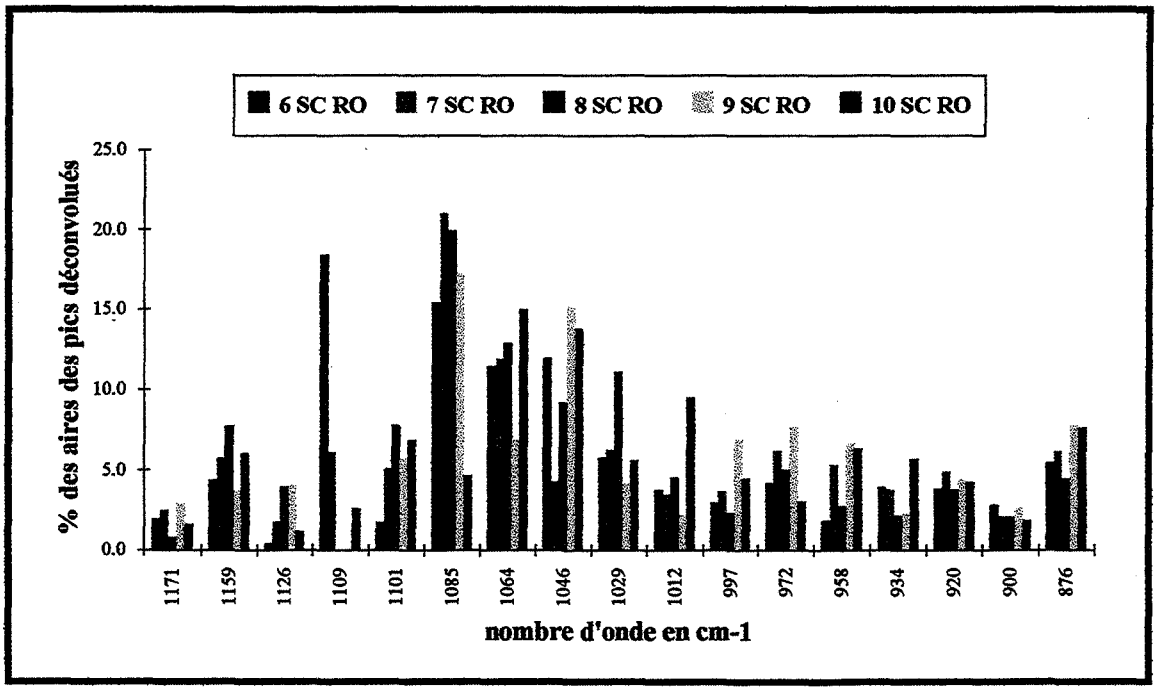


figure 51

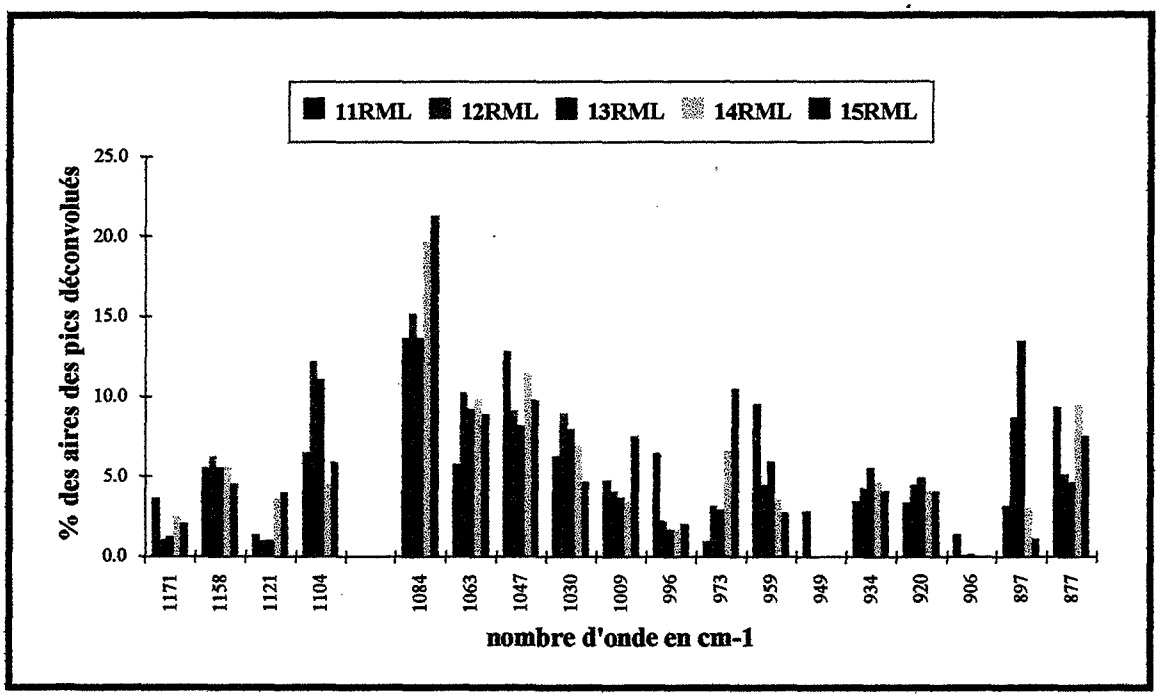


figure 52

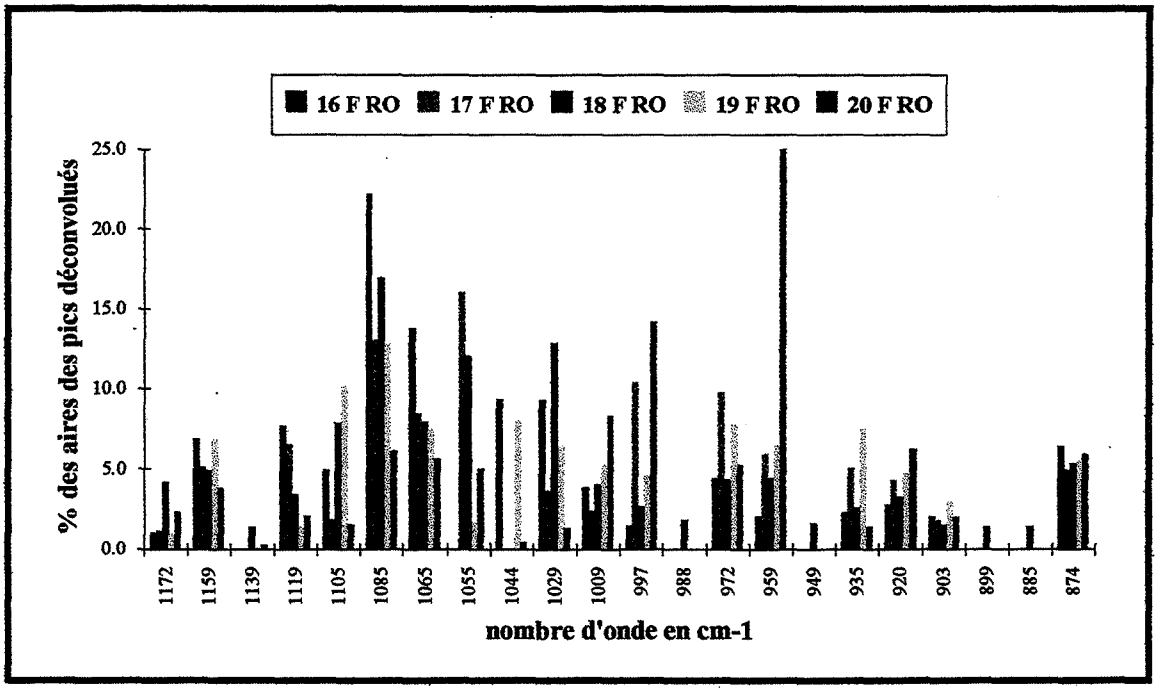


figure 53

La figure 54 est un récapitulatif de ce travail de déconvolution pour un individu de chaque groupe examiné. L'individu, à l'intérieur d'une même série est l'individu « moyen ». Cette figure met en évidence la bande supplémentaire à 1055 cm^{-1} pour le rat du groupe ayant participé au vol spatial (FRO).

On observe des pourcentages relativement élevés pour la bande composite (carbonate et hydrogénophosphate) à 875 cm^{-1} respectivement pour les rats très jeunes du groupe LO (sacrifiés au départ de la mission) et pour les groupes SC RML et F RML (ayant subi un temps de récupération après la simulation ou le vol spatial). Par contre, les individus du groupe VC RML, du même âge mais ayant séjourné uniquement en vivarium présentent un pourcentage plus faible pour cette bande. Les spectres des rats sacrifiés au bout de 14 jours présentent tous des pourcentages plus faibles.

On peut émettre quelques *hypothèses* sur ces observations :

1) pour les rats du groupes LO (**figure 50**), les plus jeunes de tous les rats observés (sacrifiés au départ de la mission), cette bande à 875 cm^{-1} pourrait être attribuée à la partie carbonate *plus* à la partie hydrogénophosphate. En effet des auteurs *(ref. 19)* on mis en évidence la présence des ions HPO_4^{2-} dans le minéral jeune ou nouvellement formé. Ces ions tendent à disparaître avec la maturité du minéral. Il est donc possible que ce groupe de rats contiennent plus ou moins de ces ions et que chez certains sujets de ce groupe, l'exaltation de la bande à 875 cm^{-1} soit dûe à la partie hydrogénophosphate.

2) pour les groupes ayant subi un stress et sacrifiés au bout de 14 jours (SC RO et F RO **figure 51 et 53**) cette bande est relativement stable et pourrait signifier que c'est uniquement une bande liée à la présence des carbonates et que, en conséquence, le minéral est *plus âgé*.

Il est d'ailleurs intéressant de remarquer la constance de la bande à 875 cm^{-1} pour tous les individus du groupe F RO (**figure 53**) alors que les autres bandes ne présentent plus aucune reproductibilité.

3) Le groupe de référence VC RML, (**figure 52**), dont les rats sont âgés de 14 jours de plus que les groupes SC RO et F RO, ne présente pas, chez tous les individus, la même aire de la bande à 875 cm^{-1}. La présence d'ions HPO_4^{2-} serait donc possible signifiant que du minéral jeune est déposé lors du remaniement naturel du tissu osseux.

Il est à noter que, pour ce type de comparaison, il aurait été très souhaitable d'avoir le groupe de rat *témoin*, ayant séjourné en vivarium, *du même âge que les groupes sacrifiés au retour de la mission*. Ce groupe ne nous est pas parvenu.

4) Les deux groupes SC RML et F RML, (**figure 54**) soumis au stress pendant 14 jours puis placés pendant 14 jours dans un vivarium pour *récupérer*, présentent une aire de la bande à 875 cm^{-1} beaucoup plus importante que les rats du même âge ayant toujours séjourné en vivarium (VCRML).

Deux hypothèses peuvent être émises :

a) le taux de carbonate augmente avec la récupération

b) l'activité cellulaire augmente très rapidement avec la cessation du stress. Une *grande quantité d'os jeune* se forme et la présence des ions HPO_4^{2-} contribuent fortement à l'exaltation de la bande à 875 cm^{-1}.

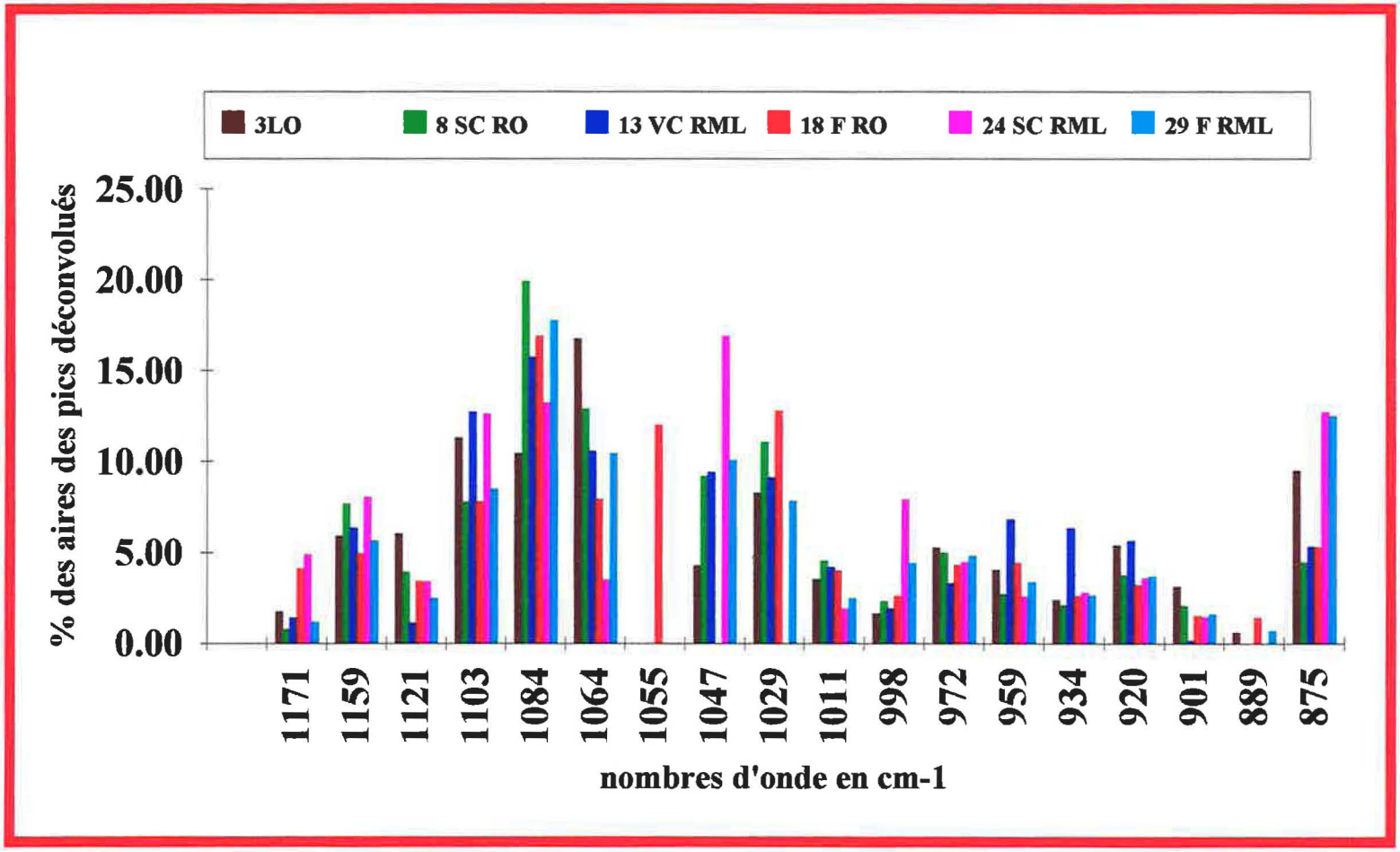

3LO
8 SC RO
13 VC RML
18 F RO
24 SC RML
29 F RML
% des aires des pics déconvolués
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
1171
1159
1121
1103
1084
1064
1055
1047
1029
1011
998
972
959
934
920
901
889
875
nombres d'onde en cm-1

figure 54

3-2-2. LA REGION 900-850 cm-1

Nous avons déconvolué les spectres de l'os cortical dans la région 900-850 cm^{-1} pour tous les rats à l'aide du logiciel GRAMS (HW = 10 cm^{-1} ; F = 2 ; Bessel)

Les **figures 55, 56, 57, 58, 59 et 60** concernent respectivement les groupes LO, SC RO, F RO, VC RML, SC RML et F RML.

Les spectres infrarouges déconvolués dans la zone des fréquences des carbonates et des hydrogénophosphates sont relativement homogènes pour la série LO **(figure 55)** et pour la série VC RML **(figure 58)**. Ces deux groupes n'ont pas subi de stress. Les rats VC RML sont âgés de 28 jours de plus que ceux du groupe LO.

On observe cependant que les déconvolutions présentent des différences dans l'allure des courbes. Les spectres des rats plus âgés ont leur maximum qui est déplacé vers les hautes fréquences.

Les rats SC RO et F RO **(figures 56 et 57)** se rapprochent, de par l'allure des courbes déconvoluées, du groupe LO mais présentent une moins bonne homogénéité à l'intérieur du groupe.

Les rats des groupes SC RML et F RML **(figures 59 et 60)** ont subi une simulation ou ont participé au vol spatial durant 14 jours. Toutefois, pendant les 14 jours qui ont suivi ils ont séjourné dans un vivarium. Il semble que les spectres de ces rats, dans leur ensemble, soient plus proches des rats jeunes que des rats du groupe de contrôle qui ont le même âge (VC RML).

temps zéro (lancement de la fusée)

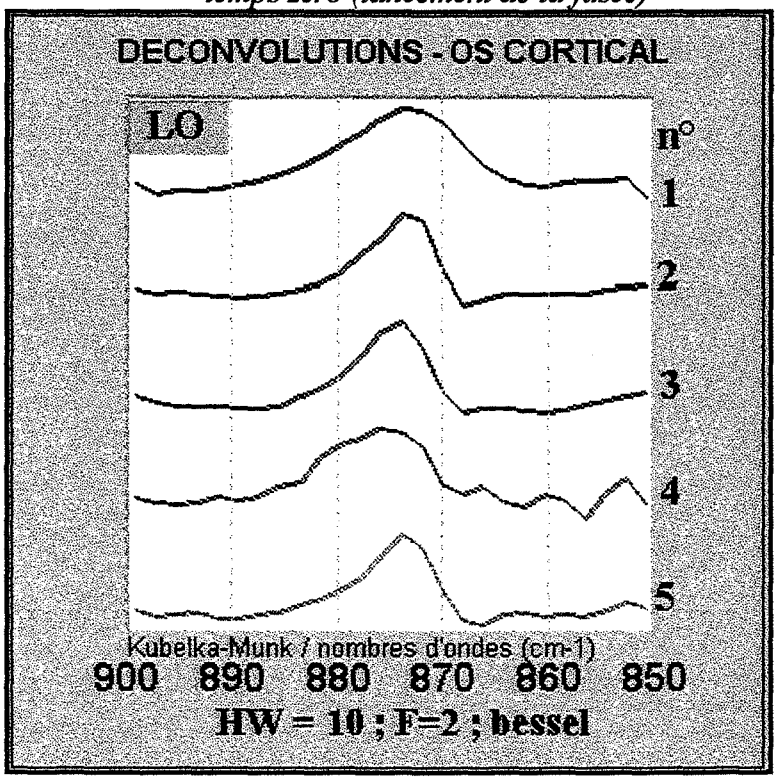


figure 55

14 jours (ayant subi une simulation de vol)

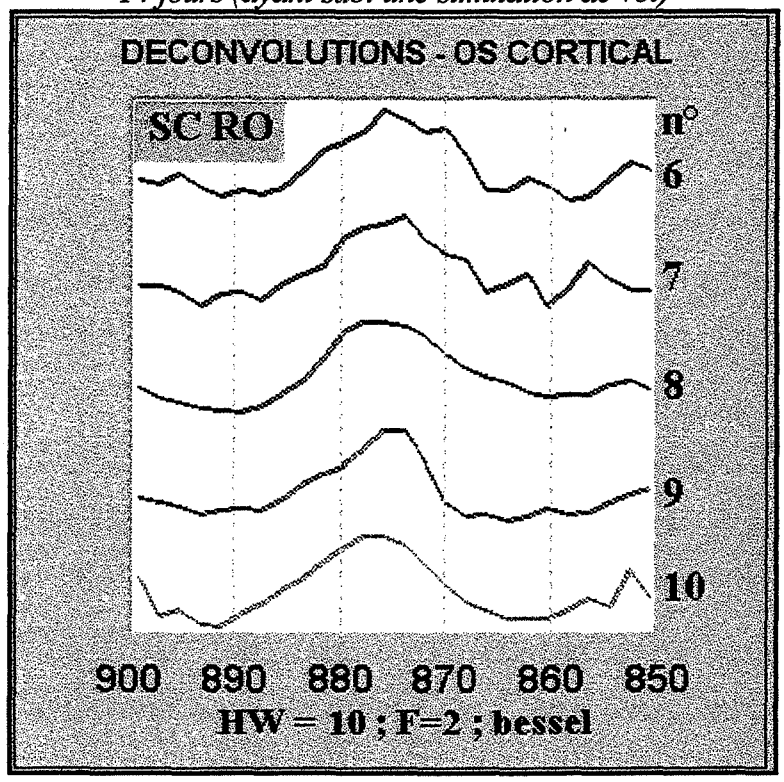


figure 56

14 jours (ayant participé au vol spatial)

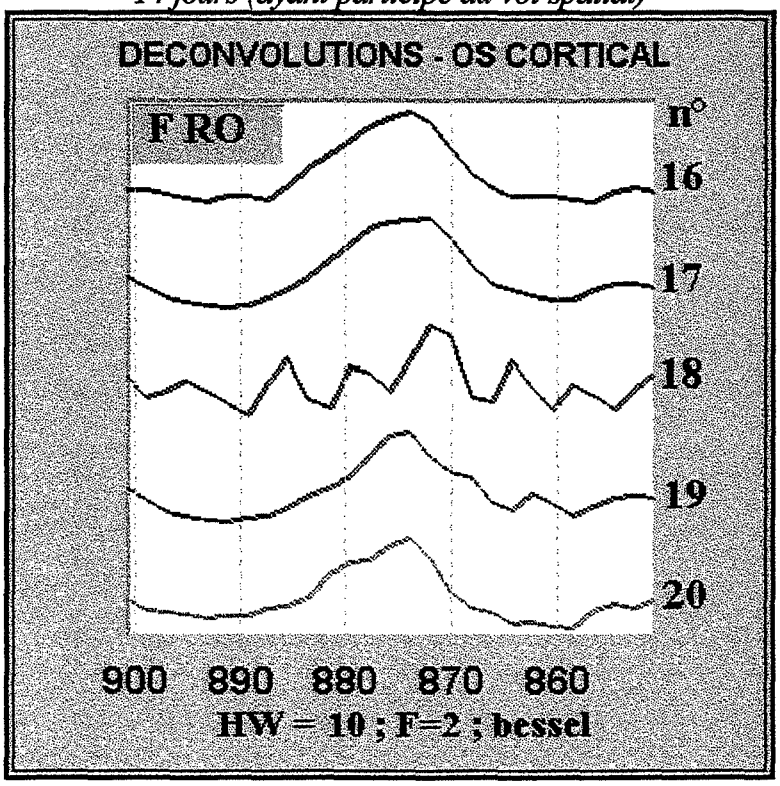


figure 57

28 jours (issus du vivarium)

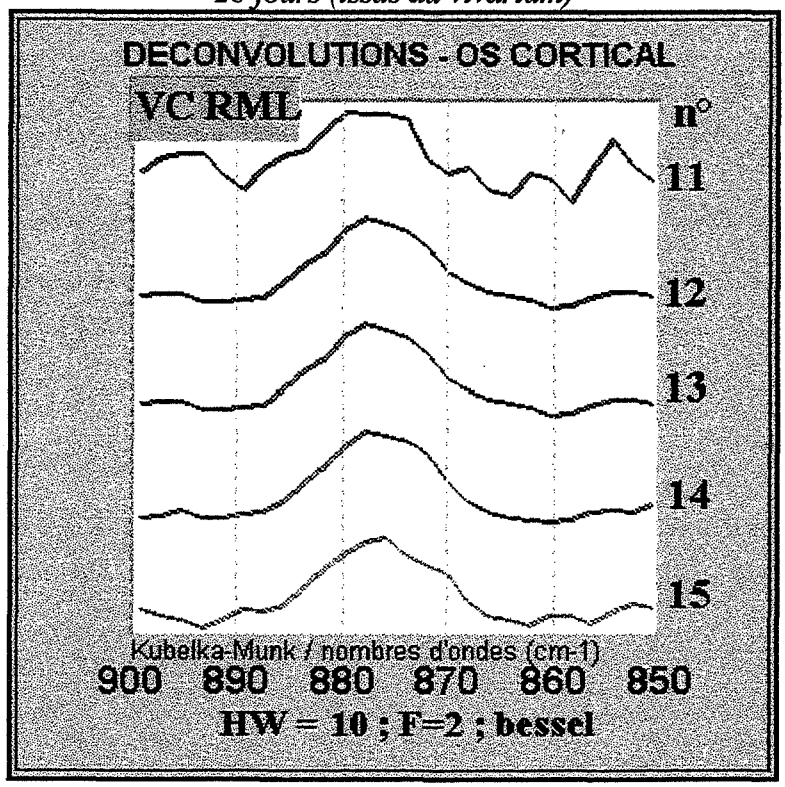


figure 58

28 jours (14 jours de simulation + 14 jours de vivarium)

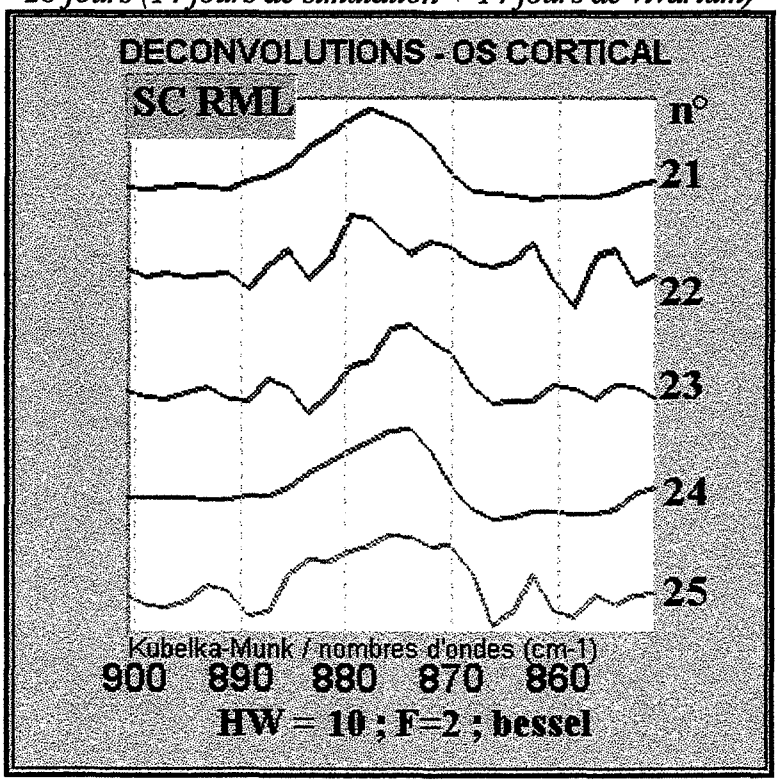


figure 59

28 jours (14 jours de vol spatial + 14 jours de vivarium)

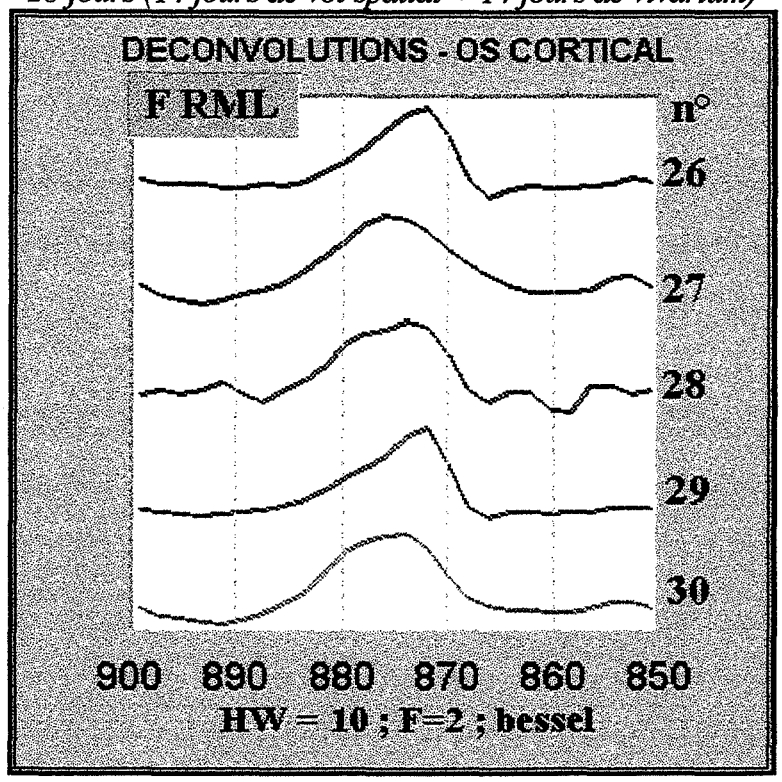


figure 60

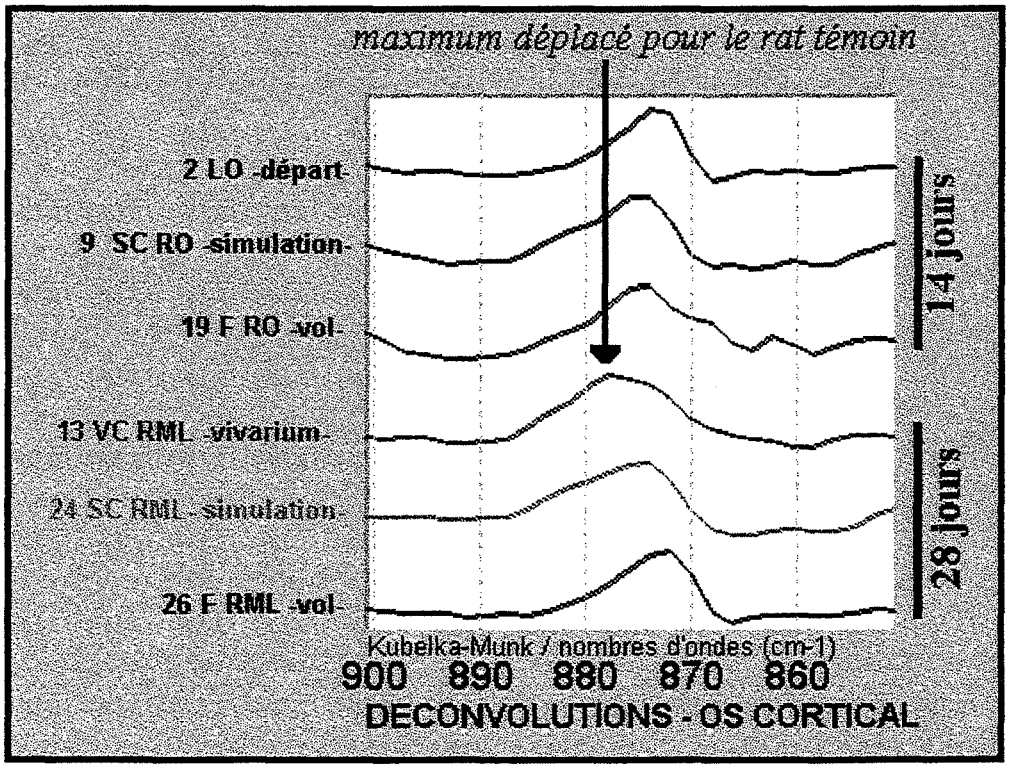


figure 61

La figure 61 est tracée en prenant un rat que l'on a *supposé représentatif* de chaque groupe afin de visualiser ces différences.

Il est généralement admis que les apatites carbonatées présentent des bandes infrarouges différentes suivant la localisation du carbonate dans le réseau. On pense que les bandes infrarouges à 1545, 1450 et 880 cm^{-1} sont attribuées à la fraction des ions CO_3^{2-} qui remplacent les ions OH^- dans le réseau de l'apatite : apatites A-CO_3 Aps. Les bandes à 1465, 1412 et 873 cm^{-1} dans d'autres environnements : surface ou à la place des ions PO_4^{3-} : B-CO_3 Aps. Il existe aussi des A-B - CO_3-Aps.

Le concept de ces seuls environnements bien définis semble de plus en plus simpliste. De très nombreux travaux sont toujours en cours dans ce domaine (**ref 90 et 91**) sur des apatites biologiques ou synthétiques.

La difficulté s'accroît lorsque l'on sait que des ions hydrogénophosphates peuvent aussi être présents (surface, jeunesse du minéral...). En effet, les cristaux des os sont beaucoup plus petits que ceux de l'émail des dents ou de certains cristaux synthétiques. Dans ces conditions, la surface, tributaire de la jeunesse du minéral, prend une importance considérable. En conséquence, toute extrapolation est risquée.

Dans ce travail, nous nous bornerons donc à l'observation. Nous noterons simplement que dans cette zone, les spectres des rats F RML (vol + récupération)), sont généralement plus proches de ceux des rats *témoins* LO plus jeunes qu'eux de 28 jours que de ceux des rats *témoins* VC RML du même âge.

Pour les rats SC RML (simulation + récupération), les spectres sont différents d'un individu à l'autre et présentent soit une analogie avec les témoins VC RML (exemple le numéro 21), soit avec le groupe ayant participé au vol avec récupération (le numéro 24).

En conclusion : *Il semblerait donc que la durée de récupération favoriserait un remaniement osseux important ainsi que la production de jeune minéral.*

3-2-3. LA REGION 1420-1370 cm^{-1}

Cette région est encore une zone d'absorption de la matière organique et de la matière minérale. La vibration vers 1379 cm-1 est connue pour être « la vibration d'ombrelle » des CH_3 (où les hydrogènes s'ouvrent et se ferment comme une ombrelle...). Elle est relativement stable chez tous les groupes de rats. Cette zone concerne une partie de « l'empreinte digitale » du spectre, riche mais difficilement exploitable. De nombreuses combinaisons de bandes ou d'harmoniques peuvent se produire.

A titre d'exemples des modes de calculs des aires nous présentons en annexe les tableaux des résultats pour tous les échantillons dans cette région.

La figure 62 est un récapitulatif de ces différents tableaux.

Les deux colonnes entourées dans le tableau ci-dessous **sont les groupes de références** *:*
- LO au décollage de la navette spatiale
- VC RML, 28 jours après le décollage

Une relative bonne répétabilité des aires pour ces deux groupes est observée.

Une fois de plus, nous déplorons l'absence des témoins VCRO (14 jours après le décollage).

Moyennes nombre d'onde cm-1	Moyennes LO % aire	Moyennes . SC RO % aire	Moyennes VC RML % aire	Moyennes F RO % aire	Moyennes SC RML % aire	Moyennes F RML % aire
1423				2.3		
1417	8.4	9.5	8.4	10.9	11.7	11.5
1409	28.9	30.8	26.9	30.1	11.3	21.6
1403	10.0	9.5	8.3	6.4	15.4	8.8
1398	9.8	10.9	10.2	8.6	13.2	11.1
1393	15.0	15.0	17.6	16.6	24.0	20.0
1386	12.1	10.5	11.6	10.0	9.9	12.2
1379	10.2	9.4	9.7	10.9	11.5	8.1
1373	6.5	3.5	7.3	5.1	5.4	8.4

TABLEAU RECAPITULATIF (voir tableaux en annexe)

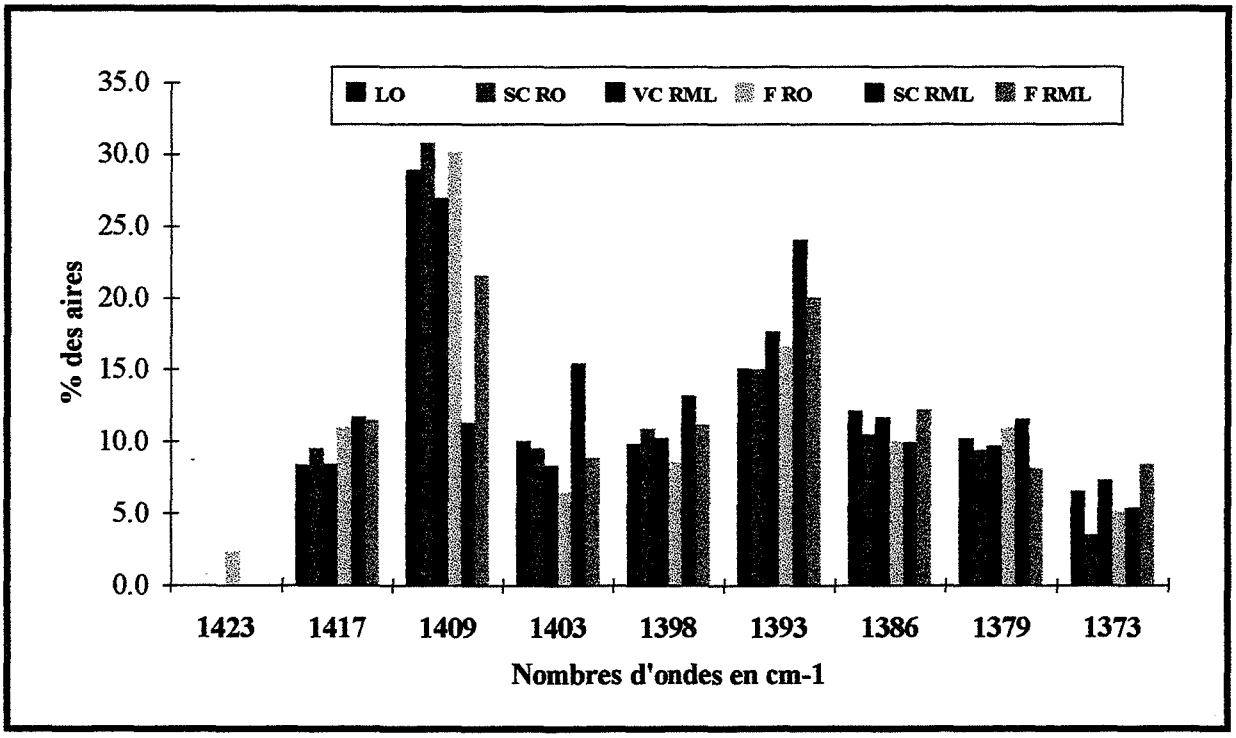


figure 62

4 - L'IRTF ET L'ANALYSE DES GAZ -

4-1. LE COUPLAGE ATG-FTIR

Le couplage analyse thermogravimétrique - spectrométrie d'absorption infrarouge est particulièrement intéressant pour *suivre et identifier* des pertes de masse lorsqu'un échantillon est soumis à une programmation de température.

La technique est brièvement décrite au chapitre II (paragraphe 2-2-2. page 32). Nous avons utilisé ce couplage car il possède l'avantage de mettre en évidence certains départs de gaz *d'une manière simultanée et sur la même prise d'essai,* très faible parfois (1.3 mg). De plus, il n'est pas nécessaire de mettre l'échantillon sous dégazage ou autre conditionnement, ce qui permet d'observer *éventuellement* des espèces adsorbées. Compte tenu de la diversité du tissu osseux suivant les localisations et les types, ces avantages sont particulièrement intéressants. Les autres techniques utilisées dans l'analyse des gaz (non couplées) nécessitent souvent plusieurs prises d'échantillons pour effectuer les différentes analyses.

Nous n'avons pas effectué d'étalonnage pour les différents gaz utilisés. Cette étude sortant de notre cadre de travail. La loi de Beer nous donne $A = \varepsilon_\lambda \, l \, c$ avec l'absorbance A reliée à la longueur de la cuve de gaz l en cm, à la concentration c en mole.l^{-1} et au coefficient ε_λ. Les hauteurs (absorbances) des différentes courbes de départ des gaz dépendent donc de leurs coefficients d'absorptions (dépendants eux-mêmes de la température). Il faut noter la grande diversité des coefficients d'absorptions pour les gaz observés dans cette étude. Par exemple, de par son coefficient élevé, le dioxyde de carbone est *très sensible* en analyse de gaz par infrarouge. On doit donc s'abstenir de *comparer quantitativemnt les départs de gaz entre eux,* si on n'a pas effectué un étalonnage au préalable.

Toutefois, dans ces analyses la longueur de la cuve est constante, le coefficient ε_λ est constant si on observe toujours la même longueur d'onde d'absorption spécifique. Une analyse *comparative, au niveau de la concentration, du même gaz entre différents échantillons* peut donc être effectuée, si l'on opére toujours de la même manière et avec la même masse de départ. Ces comparaisons sont toutefois semi-quantitatives. Les facteurs analytiques (reproductibilité, justesse...) n'étant jamais pris en compte. Une étude soignée serait très longue mais intéressante.

Les courbes sont exprimées en unités arbitraires. Toutefois, nous avons, *dans un souci d'homogénéisation des résultats,* divisé l'absorbance de tous les gaz par la masse d'échantillon du départ exprimée en mg et donné le résultat en pourcentage de cette masse. Les masses de départ se situaient entre 1 à 3 mg pour l'os trabéculaire et 13 à 16 mg pour l'os cortical. Parfois, un ou plusieurs gaz ne sont pas présents sur les courbes d'une manipulation pour des raisons diverses (échec dans la manipulaton -problème de logiciel- pour ce gaz, manque de sensibilité dûe à la trop faible prise d'essai initiale). *Nous rappelons que la zone spatiale d'analyse du fémur des rats est très délimitée de manière à s'affranchir le plus possible de l'hétérogénéité naturelle de l'os.*

4-2. LES SPECTRES DES GAZ OBSERVES

L'absorption des photons dans le domaine de l'infrarouge moyen modifie les états de vibration et de rotation des molécules qui absorbent le rayonnement. Les spectres des gaz sont différents de ceux des solides car on observe fréquemment la modification des états de rotation d'où l'aspect des bandes multiples. Les règles de sélection peuvent donner une allure de spectre typique comprenant deux massifs de « raies » presque symétriques. Dans les solides les bandes observées sont « l'enveloppe » de ces différentes absorptions (*éléments de théorie en annexe*).

A titre d'exemple, pour répertorier quelques spectres de gaz analysés, nous présentons différents dégagements gazeux pour l'os trabéculaire et l'os cortical du rat 17 F RO. **(figure 63 et figure 65)**

- la vapeur d'eau (H_2O)
- le dioxyde de carbone (CO_2)
- le gaz ammoniac (NH_3)
- le monoxyde de carbone (CO)

Les spectres de la vapeur d'eau et du dioxyde de carbone sont familiers aux utilisateurs de la spectrométrie à transformée de Fourier puisqu'ils représentent souvent l'air ambiant du laboratoire. Le principe de la mesure : acquisition du « blanc » *puis* acquisition de l'échantillon permet de reconnaitre très facilement sur la première acquisition la vapeur d'eau et le dioxyde de carbone, lorsque l'appareil n'est pas assez purgé en air sec et propre. Lorsque l'absorption de ces vapeurs se situent dans des zones d'absorption soumises à l'étude, il est impératif d'effectuer une purge soignée. La présence de la vapeur d'eau et du dioxyde de carbone dans l'air ambiant *et* l'acquisition des spectres infrarouges en deux temps sont l'inconvénient *majeur* de la spectrométrie à transformée de Fourier.

La figure 64 et la figure 66 montrent le dégagement de différents gaz, en fonction de la montée en température lorsqu'on travaille en couplage ATG-FTIR. Cette présentation convient bien pour *l'allure générale du déroulement de la manipulation*.

Ces figures nous donnent un aperçu de certains départs de gaz pour l'os trabéculaire et l'os cortical.

Nous notons la présence de dioxyde de carbone dès 60°C, dans l'os trabéculaire et l'os cortical, et de vapeur d'eau durant toute la manipulation. Le dégagement du gaz ammoniac semble débuter avec l'accroissement des bandes de vibrations (streching) des liaisons C-H dûes à la matière organique. *Un fait important* est la présence, en fin de manipulation vers 650°C, de monoxyde de carbone dans l'os cortical **(figure 66).** Cette présence n'est pas observée pour l'os trabéculaire. Elle sera confirmée en couplage analyse thermique/spectrométrie de masse.

EXEMPLE N° 1 : OS TRABECULAIRE 17 F RO

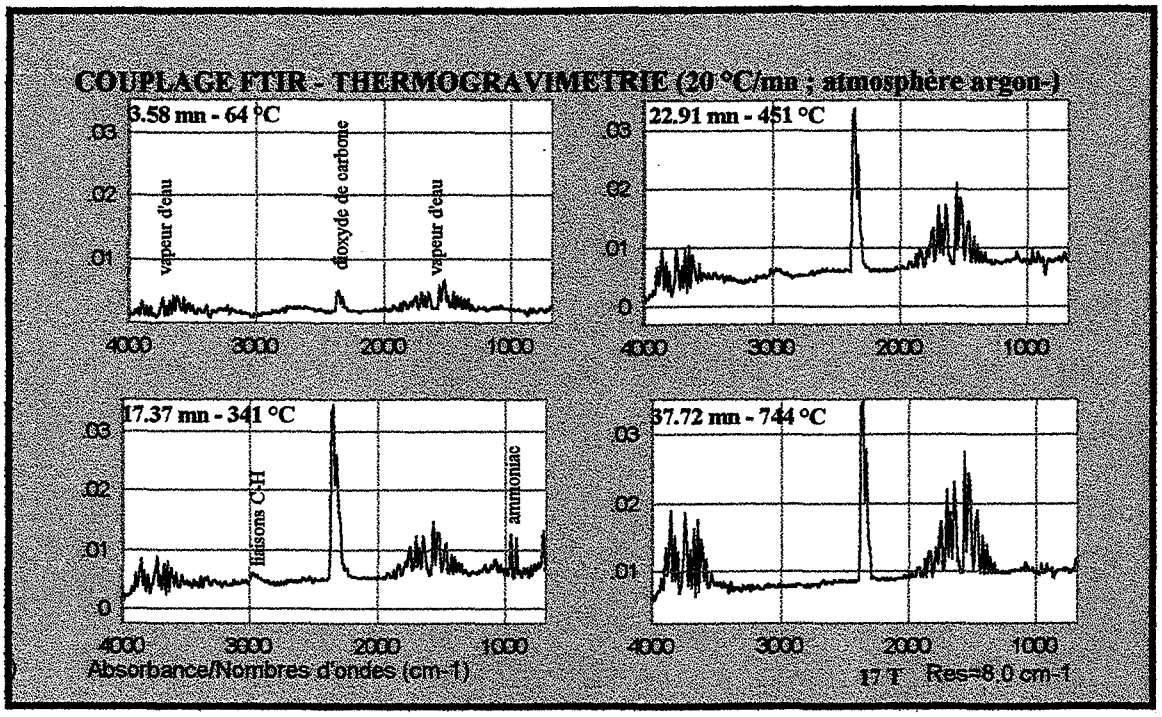


figure 63

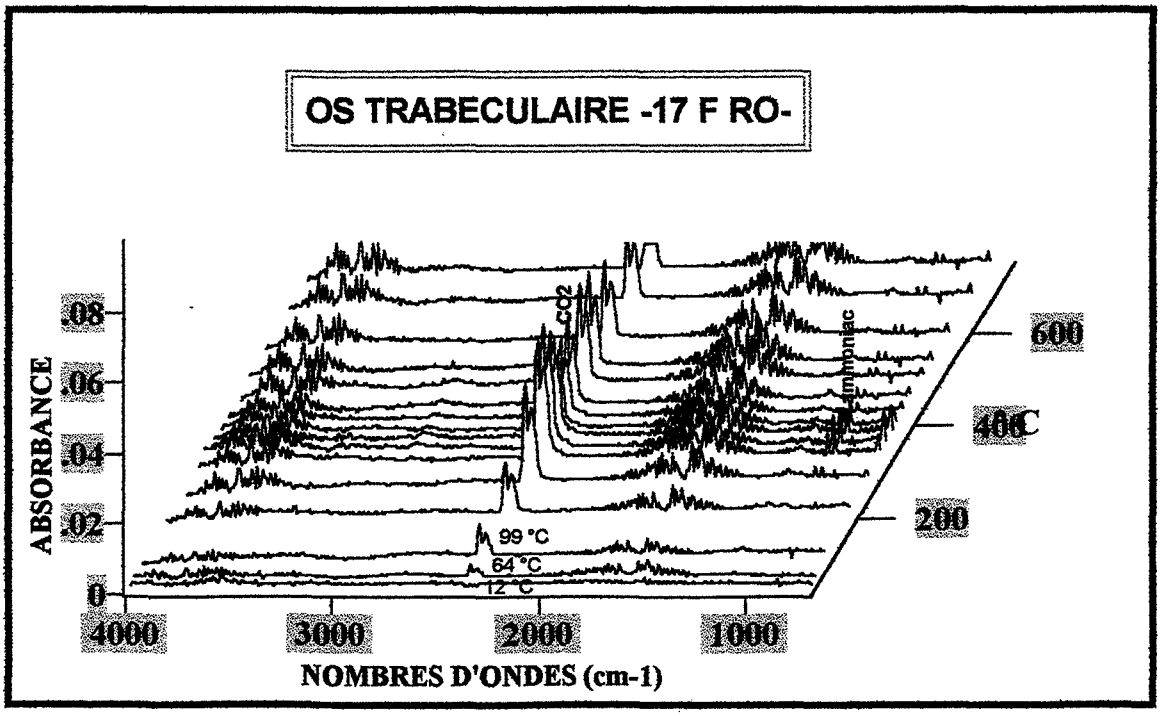


figure 64

EXEMPLE N° 2 : OS CORTICAL 17 F RO

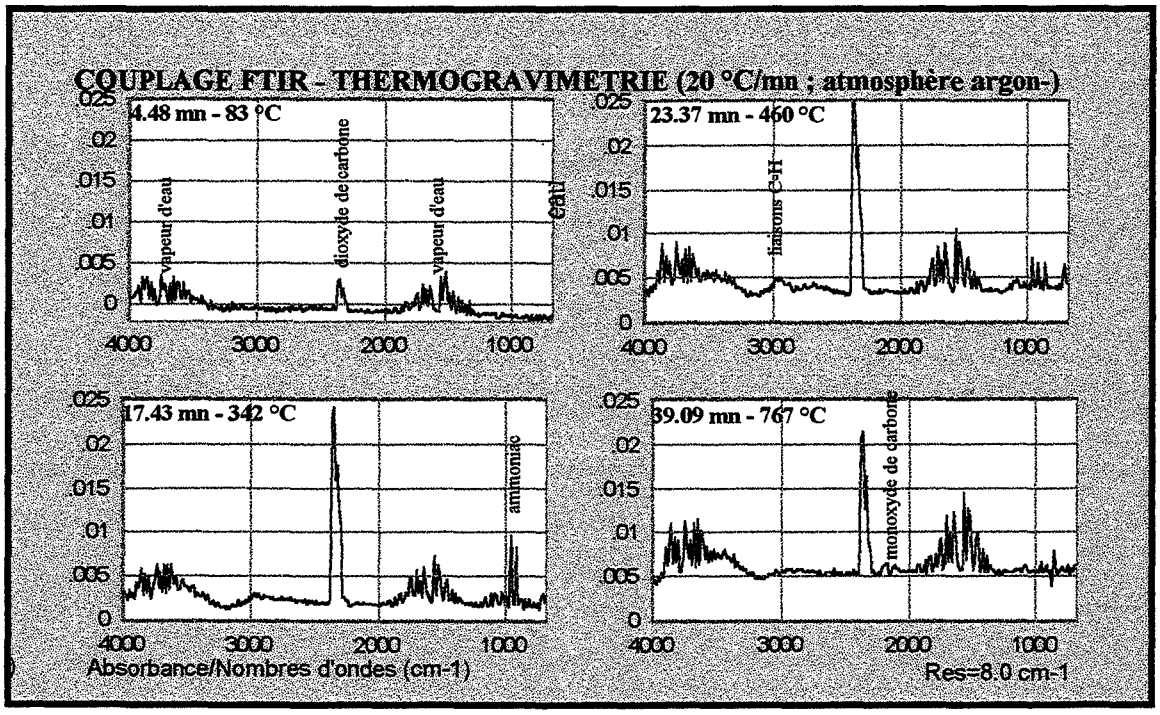


figure 65

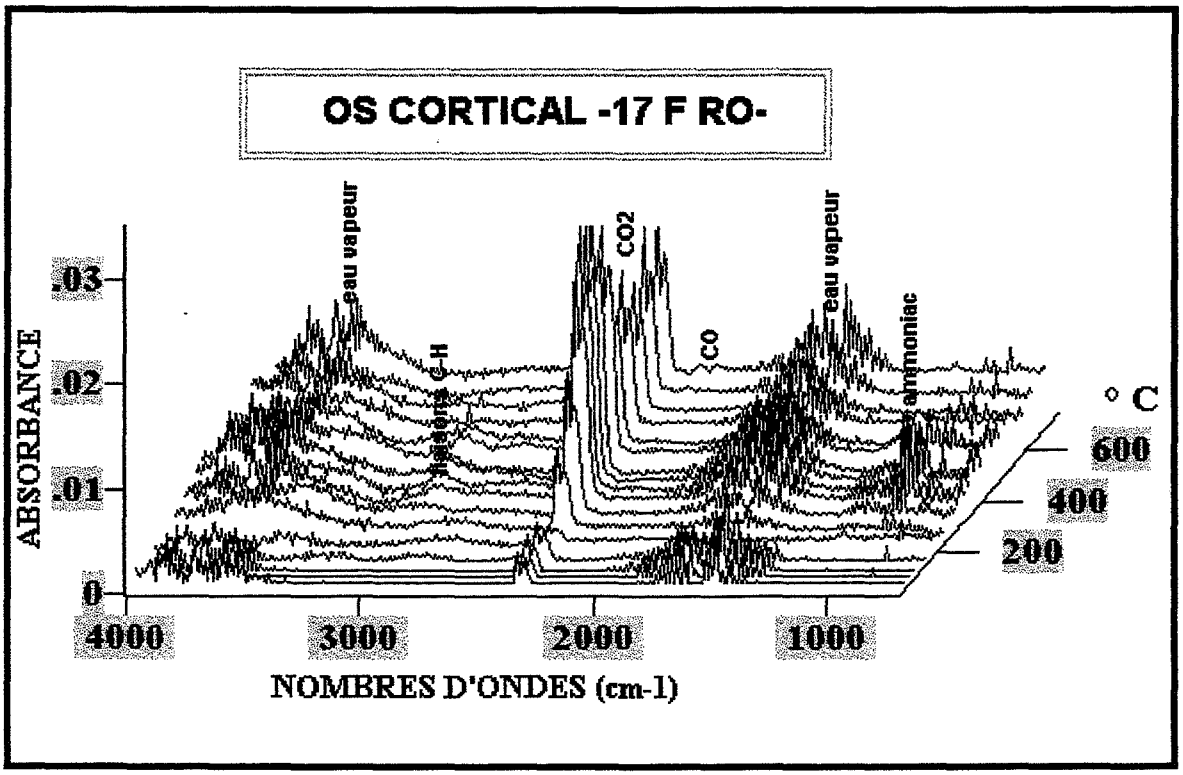


figure 66

4-3. LES DEPARTS DE L'ENSEMBLE DES GAZ

Le logiciel donne le nom de « *chromatogram* » au tracé en fonction du temps de la somme de toutes les absorptions enregistrées par le détecteur à chaque instant, suivant la méthode Gram Schmidt (voir description au paragraphe 2-2-2. page 32).

Le couplage CHROMATOGRAPHIE-FTIR est beaucoup plus utilisé que le couplage ANALYSE THERMIQUE-FTIR d'où ce nom impropre de *chromatogram* pour le couplage ATG-FTIR.

Les figures 67 et 68 nous présentent les *chromatogrames* de différents essais pour l'os trabéculaire et l'os cortical.

Ces différents tracés ne représentent pas un phénomène physique au sens strict puisqu'il s'agit d'une sommation d'absorbance pour les différents départs *simultanés* de gaz n'ayant pas le même coefficient d'absorption Toutefois, l'allure et la reproductibilié de ces *chromatogrames* sont une indication de l'échantillon. Un échantillon identique donne un chromatograme identique puisque les départs de gaz sont identiques, pour les mêmes conditions analytiques.

L'os cortical :

La figure 67 présente 3 chromatogrames de l'os cortical :
- du fémur du rat témoin 12 VC RML ayant toujours séjourné en vivarium.
- du fémur du rat ayant participé au vol 17 F RO
- du fémur du rat ayant participé au vol et ayant séjourné en vivarium 29 F RML

1) Les départs de gaz entre 0 et 200 °C (surtout de l'eau et du dioxyde de carbone) sont nettement plus importants pour le rat témoin (courbe rouge) que pour les rats ayant participé au vol .

2) La courbe du rat témoin monte constamment après 650 °C alors que les départs des gaz pour les autres courbes sont pratiquement constants.

L'os trabéculaire :

La figure 68, présente 5 chromatogrames de l'os trabéculaire :
- du fémur du rat témoin 12 VC RML ayant toujours séjourné en vivarium.
- du fémur du rat soumis à une simulation 6 SC RO
- du fémur du rat ayant participé au vol 17 F RO
- du fémur du rat ayant participé au vol et ayant séjourné en vivarium 29 F RML
- du fémur du rat soumis à une simulation et ayant séjourné en vivarium 25 SCRML

1) Les départs de gaz sont les plus importants entre 300 et 400 °C

2) Les rats témoins (sacrifiés au bout de 28 jours) et les rats soumis au stress (sacrifiés au bout de 14 jours) présentent des départs en progression à partir de 400 °C alors que les rats ayant participé au vol et à la simulation ont des courbes constantes à partir de 400° C.

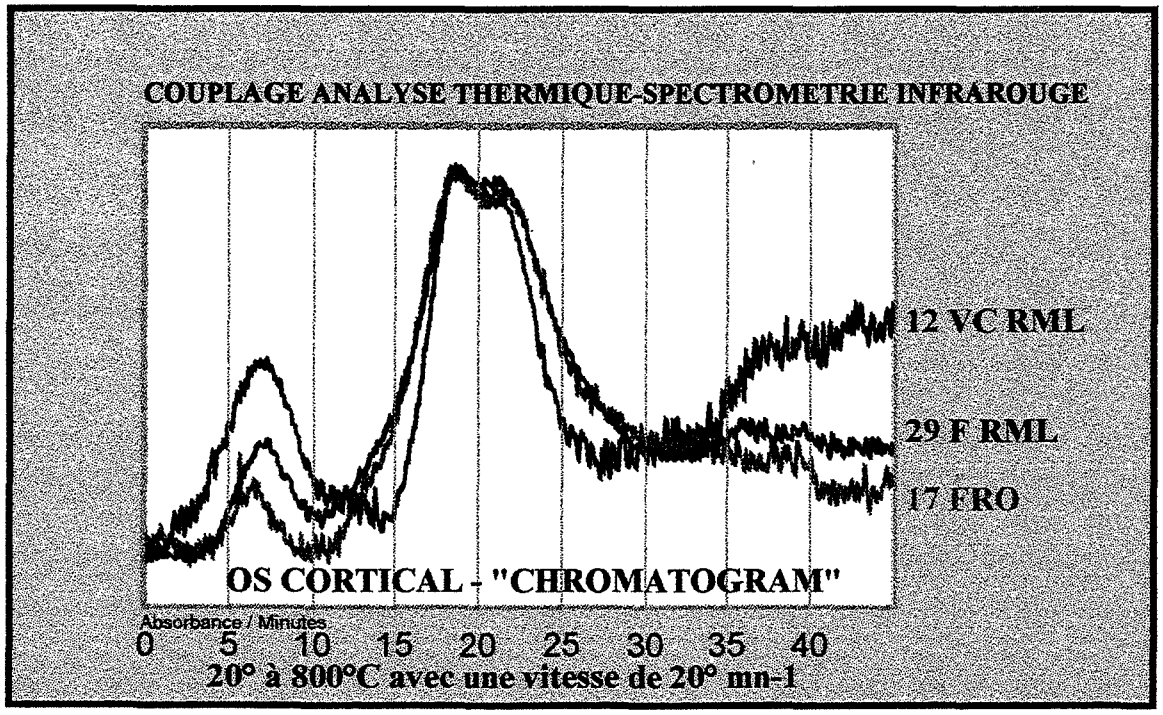


figure 67

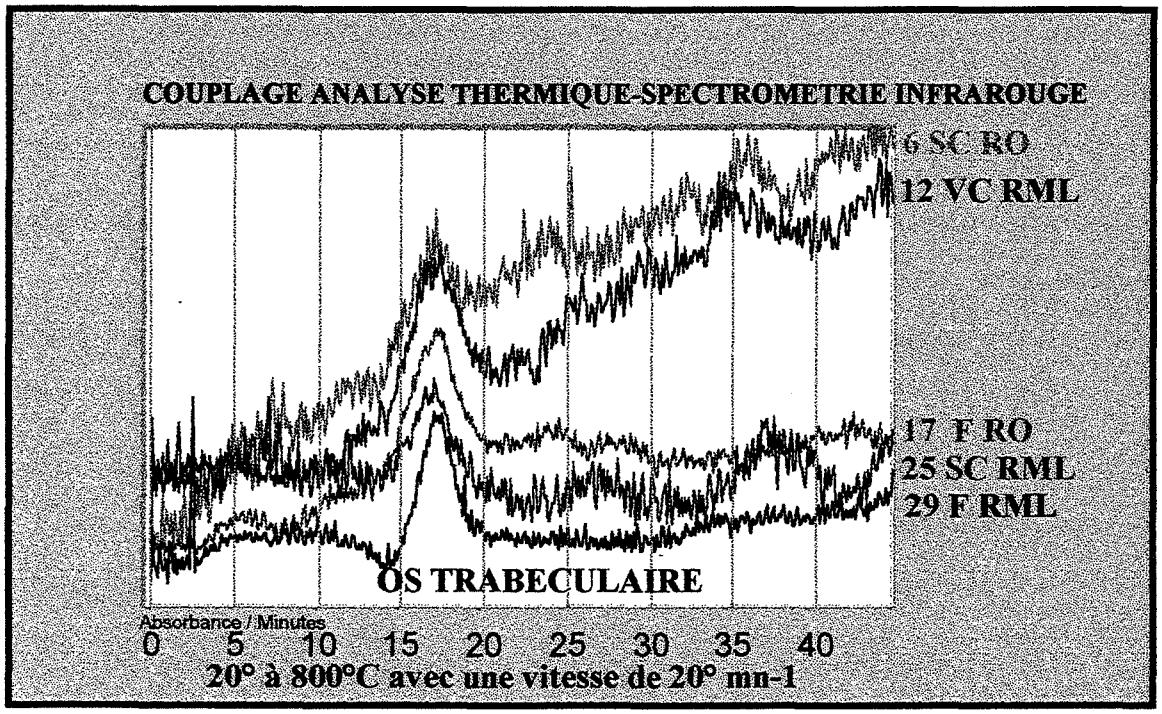


figure 68

Commentaires

Ces courbes sont intéressantes, surtout pour l'os trabéculaire qui n'a pas pu être étudié sur le solide.

Les chromatogrames des rats ayant été soumis au vol au bout de 14 jours et de 28 jours sont différents des rats témoins.

4-4. LES DEPARTS DES GAZ

Les tableaux 1 à 6 et les figures 69 à74 représentent, pour différents essais, les départs des gaz en fonction de la température.

La manipulation avec l'os cortical du témoin 12 VC RML est incomplète. Il manque la partie eau vapeur. Nous n'avons pas recommencé la manipulation et nous avons préféré garder le seul témoin qui restait du groupe (14 VC RML) pour le couplage ATG-spectrométrie de masse.

Les départs de dioxyde de carbone semblent différents dans l'os cortical et l'os trabéculaire.

- une courbe avec, grossièrement, un seul maximum vers 400°C pour l'os cortical.
- une courbe présentant plusieurs départs (vers 300°C et 450°C) pour l'os trabéculaire.

La présence de monoxyde de carbone à partir de 650 °C pour l'os cortical sera confirmé ultérieurement.

Le gaz ammoniac qui se libère encore à 750°C.

La présence d'eau pendant toute la manipulation

D'autres commentaires seront présentés sur les départs de ces gaz réalisés avec le couplage ATG-spectrométrie de masse. *Il est toutefois extrèmement délicat d'essayer de montrerr des différences dans les dégagements de gaz entre certains échantillons. En effet, la masse de départ de l'os trabéculaire se situe entre 2 et 3 mg de produit (ou moins), les dégagements gazeux durent 40 minutes et il reste encore la partie minérale lorsque la manipulation est terminée...*

Les différentes manipulations ont toutefois permis d'observer les grandes tendances de tous ces départs avec le minimum de produit.

Les courbes de pertes de masse seront présentées ultérieurement avec les techniques annexes.

OS CORTICAL : rat 12 VC RML - masse : 15,2mg -

rat 12 C pic	minutes	os cortical rat N°12 temperatures °C	964 NH3	2360 CO2	968-297 CH	2177 CO	% CO	masse :15.2 mg % CH	% NH3	% CO2
2	2.1	33		0.0042			0.000	0.000	0.000	0.027
3	3.34	59		0.0067			0.000	0.000	0.000	0.044
4	5.04	94		0.0084			0.000	0.000	0.000	0.055
5	7.13	137		0.0088	0.0004		0.000	0.002	0.000	0.058
6	8.88	172		0	0		0.000	0.000	0.000	0.000
7	11.25	220		0.0041	0		0.000	0.000	0.000	0.027
8	13.74	269		0.004	0		0.000	0.000	0.000	0.026
9	15.27	299	0	0.0028			0.000	0.000	0.000	0.018
10	17.13	337	0.0044	0.0079	0.0002		0.000	0.001	0.029	0.052
11	18.77	367	0.0089	0.0129	0.0006		0.000	0.004	0.059	0.085
12	21.32	420	0.0073	0.0087	0.0004		0.000	0.003	0.048	0.058
13	23.58	464	0.0055	0.0056	0.0018		0.000	0.012	0.036	0.037
14	25.61	504	0.0041	0.0074			0.000	0.000	0.027	0.049
15	28.55	562	0.0028	0.0076			0.000	0.000	0.018	0.050
16	31.72	626	0.0025	0.0078			0.000	0.000	0.017	0.051
17	34.49	681	0.0022	0.0068		0.001	0.005	0.000	0.014	0.045
18	36.41	719	0.0021	0.0081		0.001	0.010	0.000	0.014	0.053
19	38.5	760	0.0021	0.0081		0.003	0.017	0.000	0.014	0.053

tableau 1

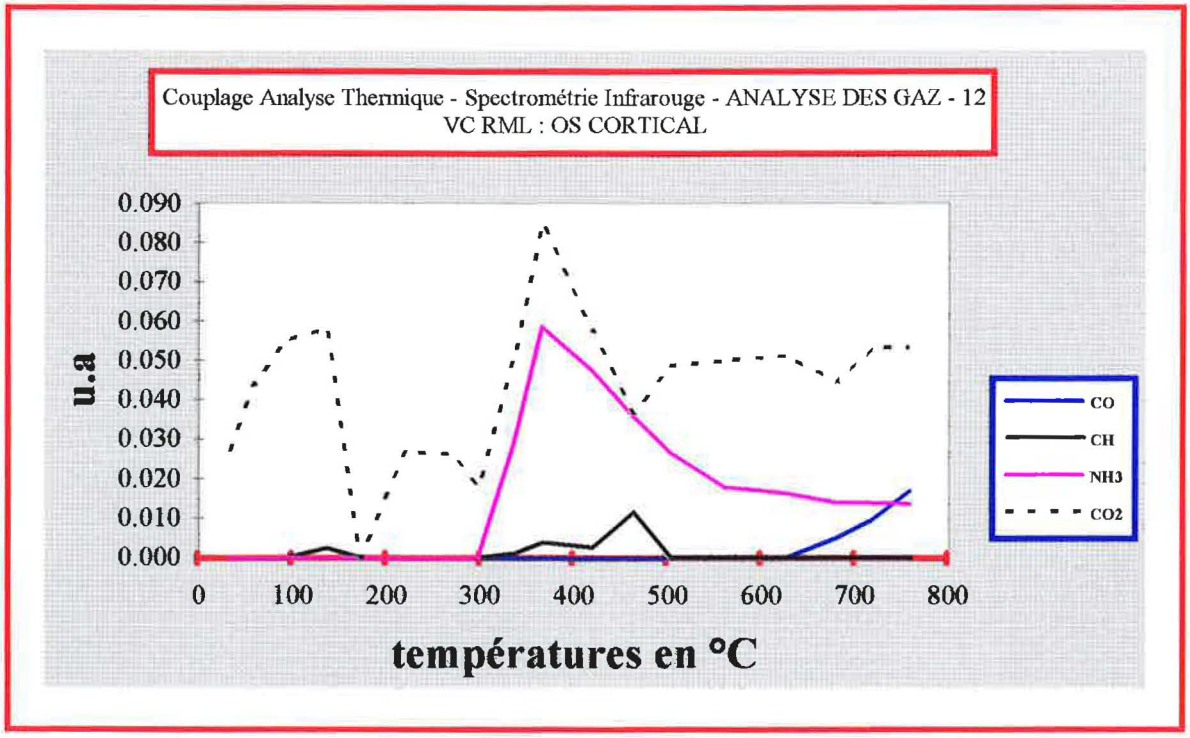


figure 69

OS CORTICAL : rat 17 F RO - masse : 14,6 mg -

rat 17C pic	minutes	os cortical rat N°17 temperatures °C	964 NH3	1556 H2O	2360 CO2	2968-2972 CH	2177 CO	% CO	masse : 14.60 % CH	% NH3	% H2O	% CO2
2	4.48	33		0.0031	0.0038	0		0.000	0.000	0.000	0.021	0.026
3	5.61	59		0.0031	0.0035	0		0.000	0.000	0.000	0.021	0.024
4	6.57	94		0.006	0.0039			0.000	0.000	0.000	0.041	0.027
5	8.89	137		0.0025	0.0036			0.000	0.000	0.000	0.017	0.024
6	9.29	172						0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	11.32	220						0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	13.41	269		0.0016	0.0073			0.000	0.000	0.000	0.011	0.050
9	15.56	299	0.0048	0.0041	0.0136			0.000	0.000	0.033	0.028	0.093
10	17.43	337	0.008	0.0041	0.0223	0.00084		0.000	0.006	0.055	0.028	0.153
11	18.46	367	0.0078	0.0058	0.0262	0.00098		0.000	0.007	0.053	0.040	0.180
12	19.92	420	0.0056	0.0064	0.027	0.0008		0.000	0.006	0.038	0.044	0.185
13	21.44	464	0.0051	0.0077	0.0281	0.00183		0.000	0.013	0.035	0.053	0.192
14	23.37	504	0.0034	0.007	0.0241	0.00058		0.000	0.004	0.023	0.048	0.165
15	25.46	562	0.0025	0.0042	0.0164	0.00046		0.000	0.003	0.017	0.028	0.112
16	28.07	626	0.0018	0.0051	0.0148			0.000	0.000	0.012	0.035	0.101
17	30.66	681	0.0017	0.0039	0.012			0.000	0.000	0.012	0.027	0.083
18	33.26	719	0.0015	0.0067	0.0157			0.000	0.000	0.010	0.046	0.108
19	36.15	760	0.0014	0.0081	0.0157			0.000	0.000	0.010	0.055	0.108

tableau 2

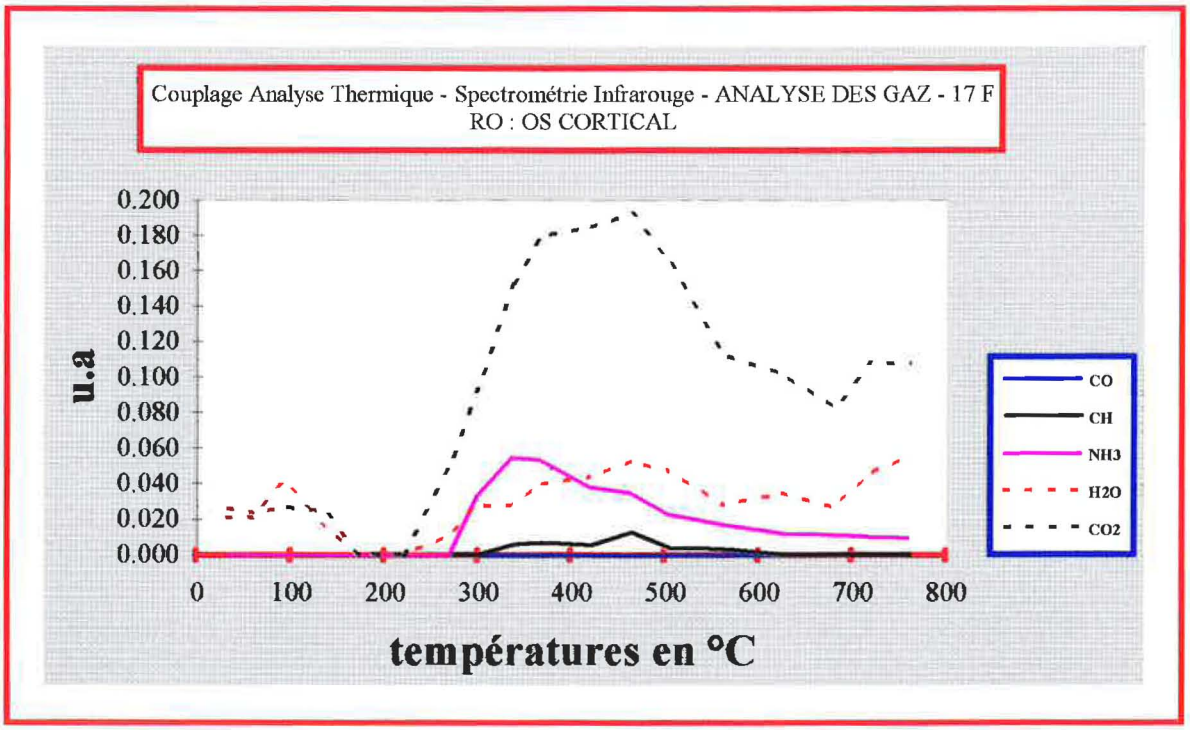


figure 70

OS CORTICAL : rat 29 F RML - masse : 15,4 mg -

os cortical rat N°29							masse : 15.4 mg			
temperatures °C	964 NH3	1556 H2O	2360 CO2	962-297 CH	2177. CO	% CO	% CH	% NH3	% H2O	% CO2
37							0.000	0.000	0.058	0.067
81		0.0089	0.0103				0.000	0.000	0.065	0.071
110		0.01	0.011				0.000	0.000	0.074	0.084
140		0.0114	0.0129				0.000	0.000	0.074	0.084
175		0.012	0.0126				0.000	0.000	0.078	0.082
218		0.0091	0.0168				0.000	0.000	0.059	0.109
263		0.0072	0.0222				0.000	0.000	0.046	0.144
291	0.0031	0.0087	0.029				0.000	0.020	0.057	0.188
317	0.008	0.0104	0.039				0.000	0.052	0.067	0.253
348	0.0152	0.0095	0.0544	0.001			0.006	0.099	0.062	0.353
372	0.0154	0.0104	0.061	0.0014			0.009	0.100	0.068	0.396
398	0.0125	0.0091	0.0572	0.002			0.013	0.081	0.059	0.372
428	0.0105	0.0093	0.0573	0.0013			0.008	0.068	0.060	0.372
458	0.0082	0.0099	0.0506	0.0021			0.014	0.053	0.065	0.328
490	0.0058	0.0129	0.0442	0.0006			0.004	0.038	0.084	0.287
525	0.0045	0.0106	0.0353				0.000	0.029	0.069	0.229
565	0.0035	0.0088	0.0283				0.000	0.023	0.057	0.184
608	0.003	0.0075	0.0245				0.000	0.019	0.049	0.159
656	0.0032	0.0087	0.0254		0.0005	0.003	0.000	0.021	0.056	0.165
676	0.0038	0.0094	0.0268		0.0008	0.005	0.000	0.025	0.061	0.174
701	0.0035	0.0128	0.0308		0.0013	0.009	0.000	0.023	0.083	0.200
734	0.0025	0.0137	0.032		0.0022	0.014	0.000	0.016	0.089	0.208
766	0.0027	0.0127	0.0302		0.003	0.019	0.000	0.018	0.082	0.196

tableau 3

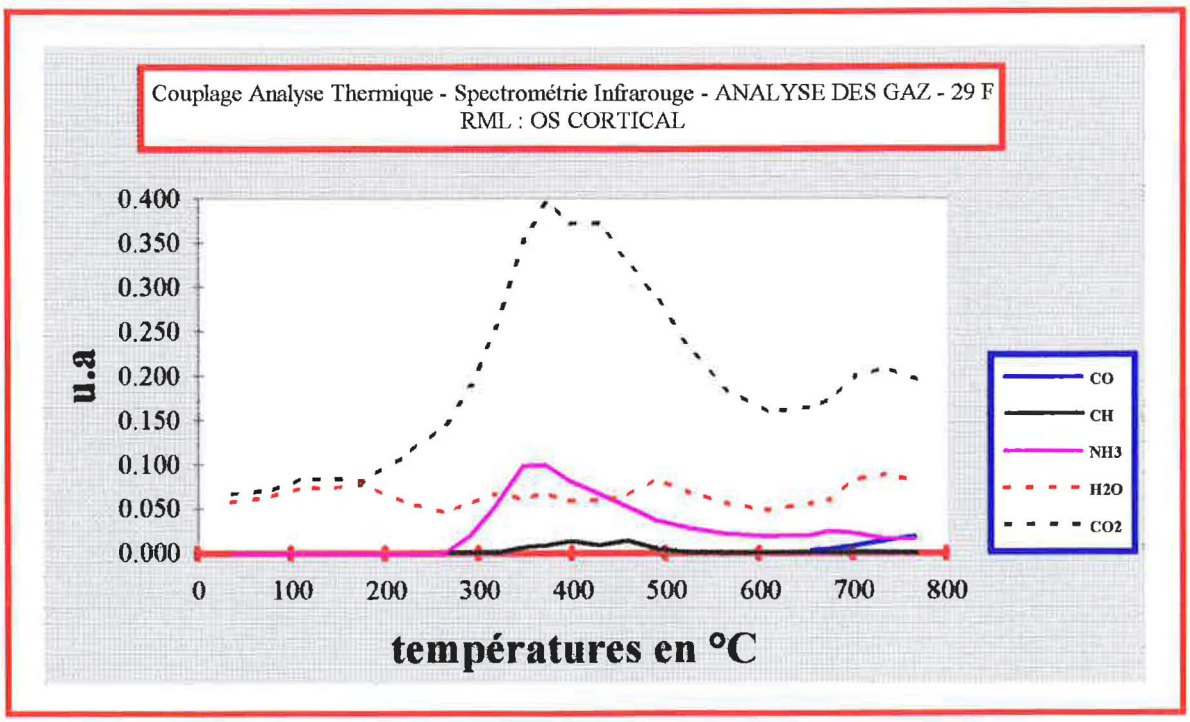


figure 71

OS TRABECULAIRE : rat 12 VC RML - masse : 1,3 mg -

rat 12T pic	os trab. rat N°12 minutes	temperatures °C	1556 H2O	2360 CO2	% H2O	% CO2
			masse : 1,3 mg			
1B	1.08	14				
2	4.02	73	0.0014	0.00175	0.108	0.135
3	7.02	134	0.00206	0.00254	0.159	0.196
4	10.01	195	0.0026	0.00359	0.200	0.276
5	12.5	245	0.00648	0.01044	0.498	0.803
6	14.76	289	0.00939	0.01597	0.722	1.229
7	16.4	322	0.01623	0.02982	1.248	2.294
8	18.15	357	0.01488	0.02795	1.145	2.150
9	20.41	402	0.01061	0.01876	0.816	1.443
10	22.96	452	0.01015	0.01778	0.781	1.368
11	25.5	502	0.01613	0.02636	1.241	2.028
12	28.27	557	0.01542	0.02733	1.186	2.102
13	29.52	582	0.01632	0.03009	1.255	2.314
14	31.27	617	0.01603	0.03046	1.233	2.343
15	34.26	676	0.0211	0.03736	1.623	2.874
16	35.68	704	0.01837	0.03558	1.413	2.737
17	37.6	742	0.01742	0.0343	1.340	2.638
18	40.88	735	0.01744	0.03382	1.342	2.602

tableau 4

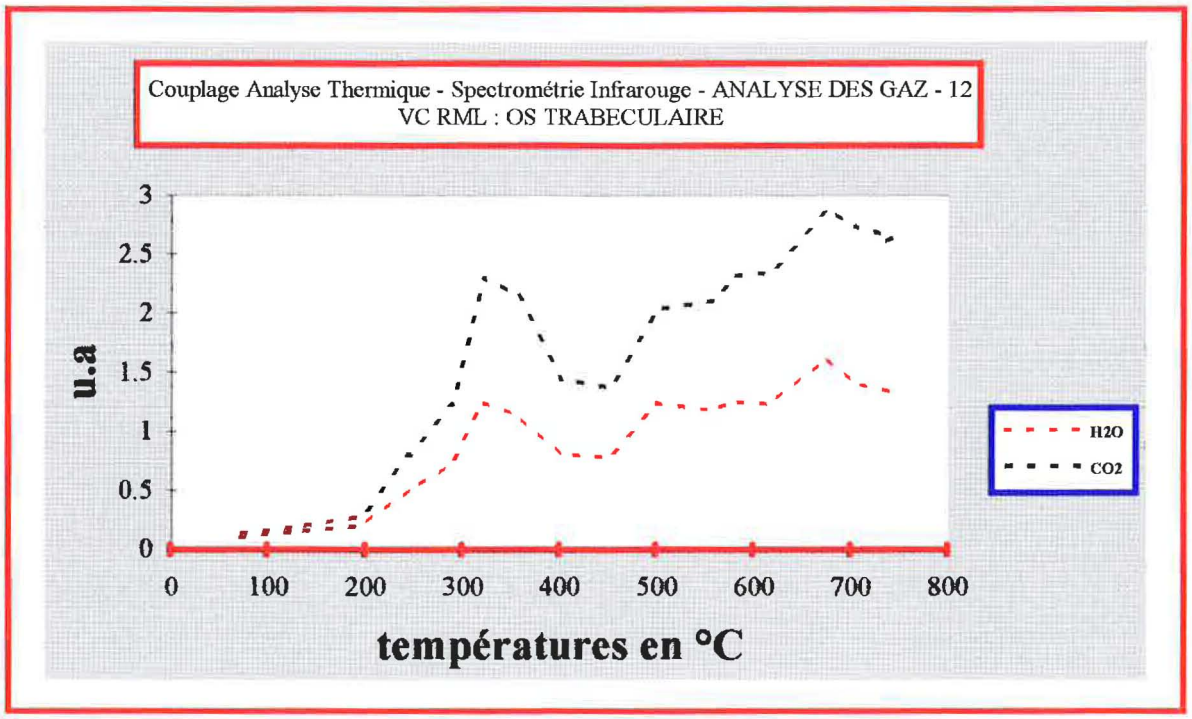


figure 72

OS TRABECULAIRE : rat 17 F RO - masse : 3 mg -

rat17T pic	minutes	os trab. rat N°17 temperatures °C	964 NH3	1556 H2O	2360 CO2	2962-297 CH	2177. CO	% CO	masse : 3 mg % CH	% NH3	% H2O	% CO2
2	0.86	12						0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	3.58	64		0.003	0.003	0.0003		0.000	0.010	0.000	0.099	0.100
4	5.27	99		0.0041	0.0088			0.000	0.000	0.000	0.138	0.293
5	9.57	186		0.0065	0.0141			0.000	0.000	0.000	0.217	0.470
6	12.85	251	0.0025	0.0095	0.0272			0.000	0.000	0.083	0.317	0.907
7	15.28	300	0.0059	0.0097	0.0341	0.0002		0.000	0.007	0.197	0.323	1.137
8	16.3	320	0.0082	0.0079	0.0349	0.0006		0.000	0.020	0.273	0.263	1.163
9	17.37	341	0.007	0.0088	0.0294	0.0016		0.000	0.053	0.233	0.293	0.980
10	18.22	358	0.0045	0.0096	0.0251	0.001		0.000	0.033	0.150	0.320	0.837
11	19.29	379	0.0035	0.0097	0.0222	0.0005		0.000	0.017	0.117	0.323	0.740
12	20.48	403	0.0025	0.0111	0.0239	0.0008		0.000	0.027	0.083	0.370	0.797
13	22.91	451	0.0022	0.0136	0.0276	0.0012		0.000	0.040	0.073	0.453	0.920
14	24.44	481	0.0022	0.0139	0.0264			0.000	0.000	0.073	0.463	0.880
15	27.38	539	0.0023	0.0128	0.0218			0.000	0.000	0.076	0.427	0.727
16	31.39	619	0.0023	0.0124	0.0213			0.000	0.000	0.077	0.413	0.710
17	34.67	684	0.0026	0.0156	0.0252			0.000	0.000	0.087	0.520	0.840
18	37.72	744	0.0017	0.0176	0.027			0.000	0.000	0.057	0.587	0.900

TABLEAU 5

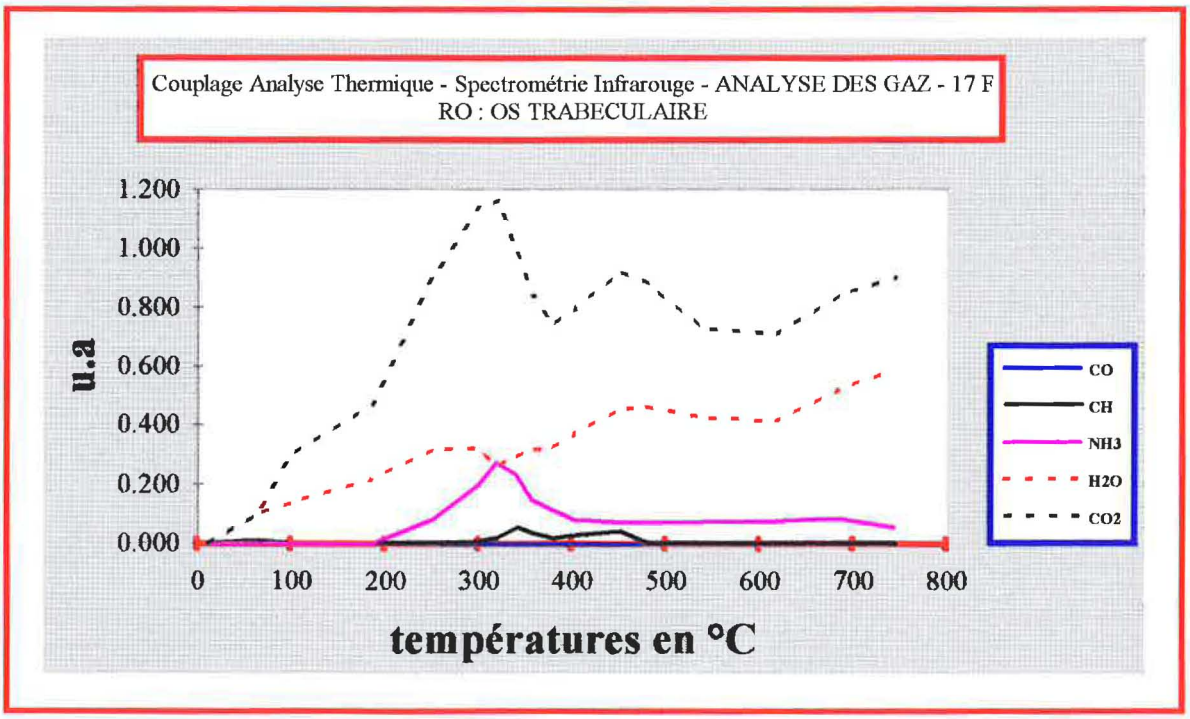


figure 73

OS TRABECULAIRE : rat 6 SC RO - masse : 2,9 mg -

rat 6T pic	minutes	os trabec. rat N°6 temperatures °C	964 NH3	1556 H2O	2360 CO2	2968-2977 CH	2177 CO	% CO	masse : 2.9 mg % CH	% NH3	% H2O	% CO2
2	2.78	48		0.0024	0.0029	0.0002		0.000	0.008	0.000	0.081	0.099
3	4.08	75		0.0056	0.0057	0.0004		0.000	0.013	0.000	0.193	0.195
4	6.62	127		0.0085	0.0101			0.000	0.000	0.000	0.292	0.350
5	9.34	182		0.0092	0.012	0.0005		0.000	0.018	0.000	0.317	0.415
6	12.61	247	0.0005	0.0125	0.0157	0.0005		0.000	0.016	0.018	0.432	0.541
7	14.25	280	0.0025	0.0143	0.0188	0.0003		0.000	0.010	0.085	0.493	0.649
8	15.61	306	0.0047	0.0175	0.0263	0.0006		0.000	0.020	0.162	0.602	0.907
9	17.08	336	0.0056	0.0184	0.0289	0.0009		0.000	0.030	0.193	0.634	0.995
10	18.61	366	0.0037	0.0183	0.0254	0.0007		0.000	0.024	0.127	0.632	0.875
11	20.7	407	0.0015	0.022	0.0266	0.0006		0.000	0.020	0.051	0.759	0.917
12	23.08	455	0.0003	0.0235	0.0277	0		0.000	0.000	0.010	0.812	0.957
13	25.06	494	0.0002	0.0247	0.0292			0.000	0.000	0.007	0.851	1.006
14	28.51	562	0.0001	0.0262	0.0296			0.000	0.000	0.004	0.904	1.022
15	32.07	633		0.0289	0.0327			0.000	0.000	0.000	0.996	1.129
16	35.01	691		0.0308	0.0348			0.000	0.000	0.000	1.063	1.200
17	37.78	746		0.028	0.0325			0.000	0.000	0.000	0.965	1.122

tableau 6

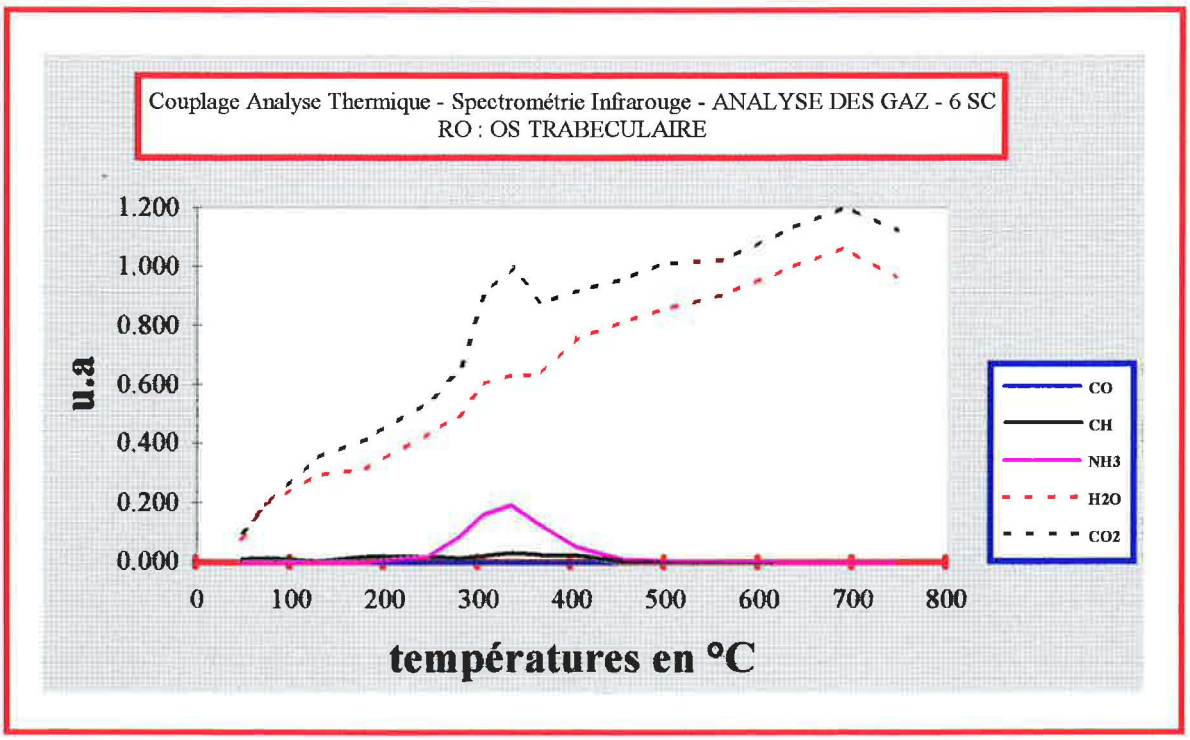


figure 74

5 - LES TECHNIQUES ANNEXES

5-1. LE COUPLAGE ATG-SPECTROMETRIE DE MASSE

Le couplage analyse thermogravimétrique - spectrométrie de masse permet de *suivre et d'identifier* des pertes de masse lorsqu'un échantillon est soumis à une programmation de température. Ce couplage original, décrit dans le chapitre II (page 31 et 33) a été mis au point au centre SPIN de l'ECOLE DES MINES DE SAINT-ETIENNE par l'équipe de M. PIJOLAT.

Les avantages de ce couplage par rapport au couplage ATG-spectrométrie infrarouge sont (en général) :

⇒ Une meilleure sensibilité

⇒ La possibilité de déterminer, à l'avance, le nombre et les masses que l'on veut suivre au cours de l'expérience

⇒ Pouvoir identifier des gaz comme l'oxygène, l'hydrogène... non accessibles avec la technique de spectrométrie infrarouge puisque leur moment dipolaire ne varie pas.

Les inconvénients sont (en général) :

⇒ La difficulté pour assigner telle masse à tel composé (pour les masses élevées).

⇒ La quasi impossibilité d'identifier, sans forte présomption, une vapeur organique.

⇒ Une technologie périphérique plus sophistiquée (vide...) et, en conséquence, des applications réduites au niveau industriel (problèmes de pollution).

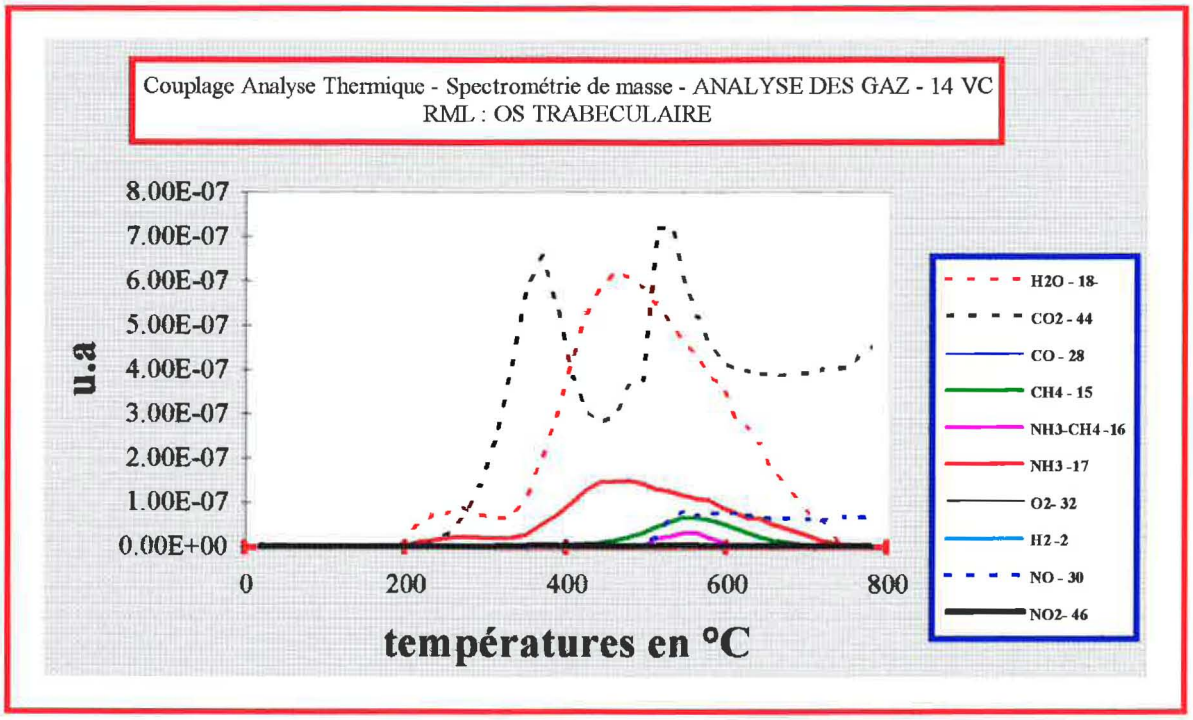
Toutes ces techniques *sont complémentaires*. Dans cette optique, mais aussi pour avoir la confirmation du départ du monoxyde de carbone uniquement dans l'os cortical (figure 69) nous avons analysé un os d'un rat provenant du groupe VC RML (28 jours - vivarium). Ce couplage concerne l'os cortical *et* l'os trabéculaire du *même prélèvement* osseux.

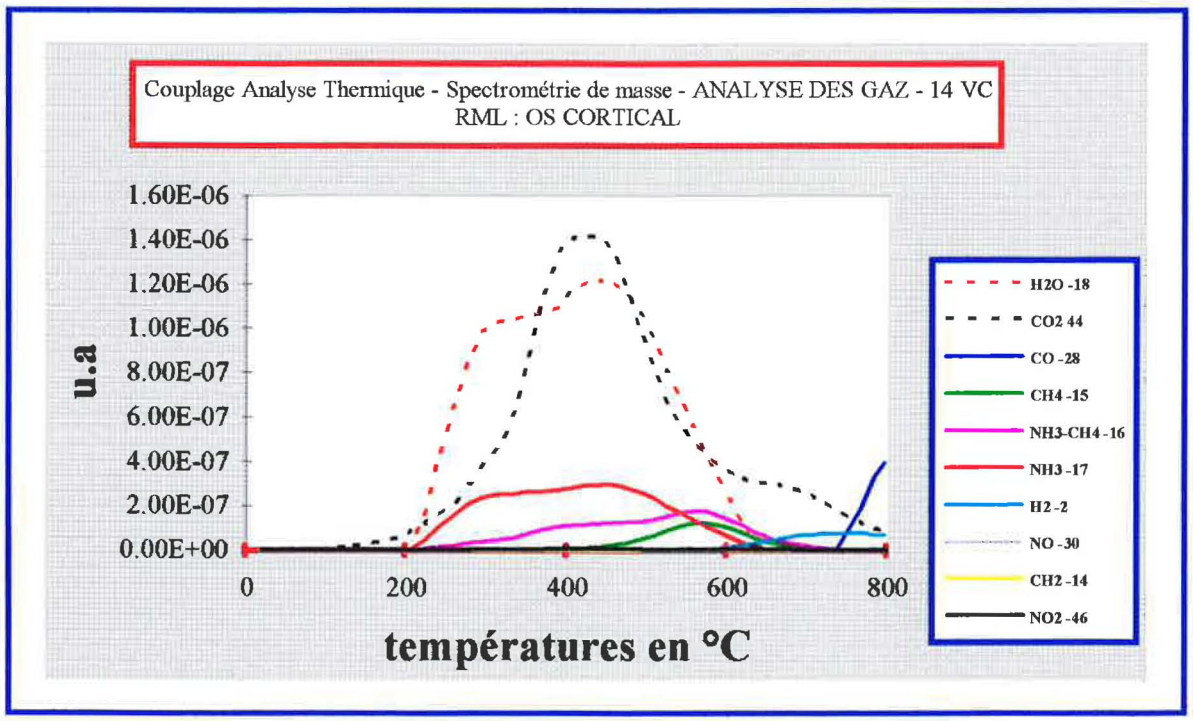
La décomposition thermique et l'analyse des gaz sont toujours des thèmes privilégiés des expérimentateurs étudiant le tissu osseux du point de vue physico-chimique. A notre connaissance, aucune analyse qualitative n'a été faite simultanément sur un aussi grand nombre de gaz et en étudiant les différences entre l'os cortical et l'os trabéculaire du même os dans les mêmes conditions analytiques. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi un rat témoin faisant partie, dès le départ, d'une sélection dont les caractéristiques biologiques sont identifiées par ailleurs.

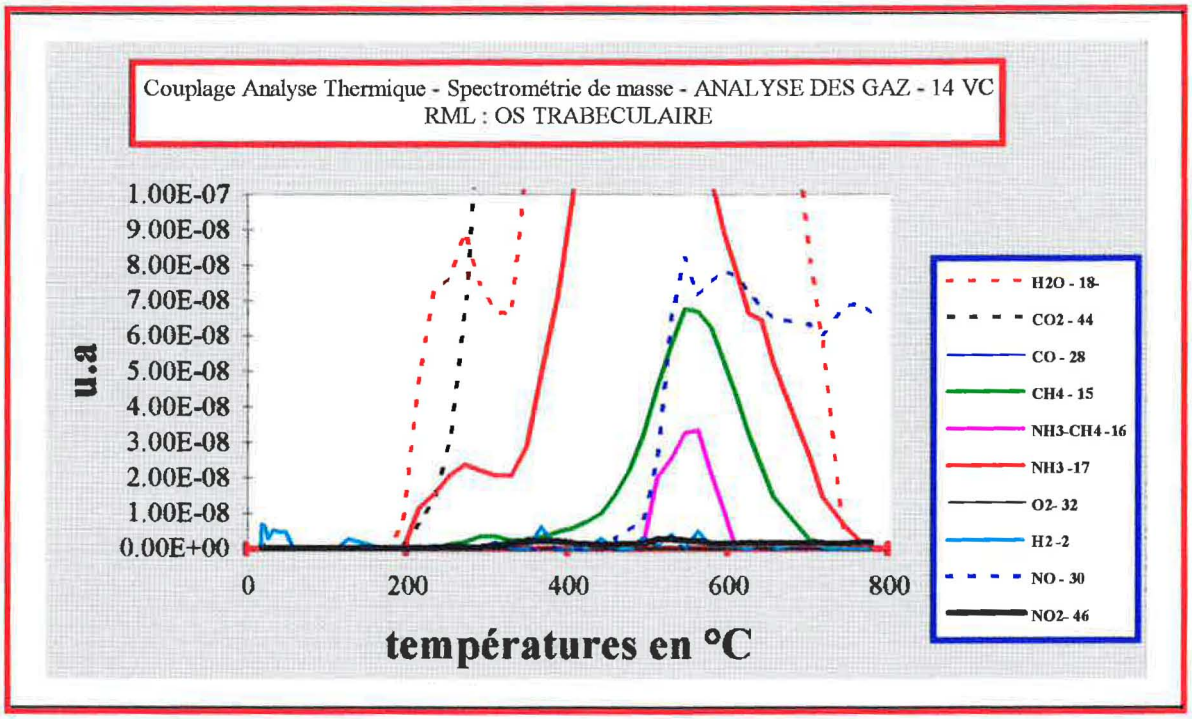
Les tableaux généraux des résultats sont présentés en annexe. les courbes relatives à ces résultats concernent l'os trabéculaire **(figure 75)** et l'os cortical **(figure 76).** Des échelles différentes pour ces deux courbes, permettent d'effectuer un grossissement et d'observer des gaz en plus faible quantité (figure 75a, 75b, 76a, 76 b). Nous avons suivi la masse de l'oxygène mais aucun départ de ce gaz n'a eu lieu.

Le mode opératoire concernant la technique est décrit au chapitre II page 33.

Les pertes de masse sont présentées au paragraphe 5-2.


Couplage Analyse Thermique - Spectrométrie de masse - ANALYSE DES GAZ - 14 VC
RML : OS TRABECULAIRE
8.00E-07
7.00E-07
6.00E-07
5.00E-07
4.00E-07
3.00E-07
2.00E-07
1.00E-07
0.00E+00
u.a
0
200
400
600
800
températures en °C
H2O - 18-
CO2 - 44
CO - 28
CH4 - 15
NH3-CH4 -16
NH3 -17
O2- 32
H2 -2
NO - 30
NO2- 46


Couplage Analyse Thermique - Spectrométrie de masse - ANALYSE DES GAZ - 14 VC
RML : OS CORTICAL
1.60E-06
1.40E-06
1.20E-06
1.00E-06
8.00E-07
6.00E-07
4.00E-07
2.00E-07
0.00E+00
u.a
0
200
400
600
800
températures en °C
H2O -18
CO2 44
CO -28
CH4 -15
NH3-CH4 -16
NH3 -17
H2 -2
NO -30
CH2 -14
NO2 -46


Couplage Analyse Thermique - Spectrométrie de masse - ANALYSE DES GAZ - 14 VC
RML : OS TRABECULAIRE
u.a
1.00E-07
9.00E-08
8.00E-08
7.00E-08
6.00E-08
5.00E-08
4.00E-08
3.00E-08
2.00E-08
1.00E-08
0.00E+00
0
200
400
600
800
températures en °C
H2O - 18-
CO2 - 44
CO - 28
CH4 - 15
NH3-CH4 -16
NH3 -17
O2- 32
H2 -2
NO - 30
NO2- 46

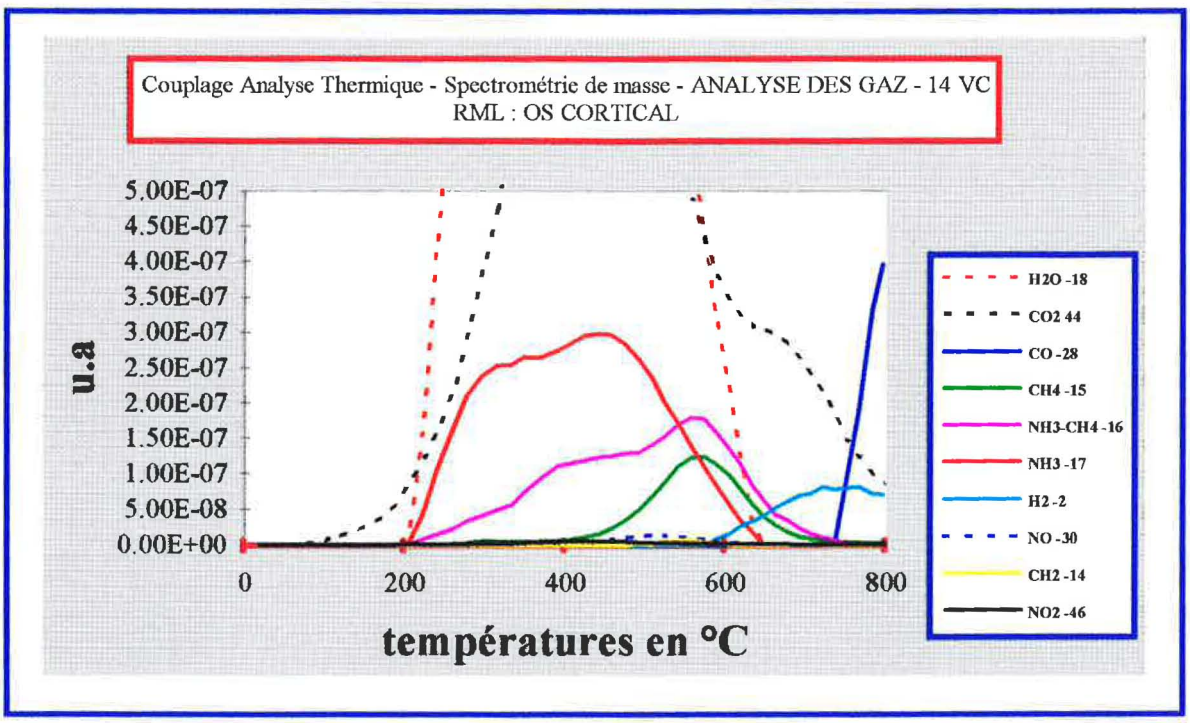

Couplage Analyse Thermique - Spectrométrie de masse - ANALYSE DES GAZ - 14 VC
RML : OS CORTICAL
u.a
5.00E-07
4.50E-07
4.00E-07
3.50E-07
3.00E-07
2.50E-07
2.00E-07
1.50E-07
1.00E-07
5.00E-08
0.00E+00
0
200
400
600
800
températures en °C
H2O -18
CO2 44
CO -28
CH4 -15
NH3-CH4 -16
NH3 -17
H2 -2
NO -30
CH2 -14
NO2 -46

figure 76 a

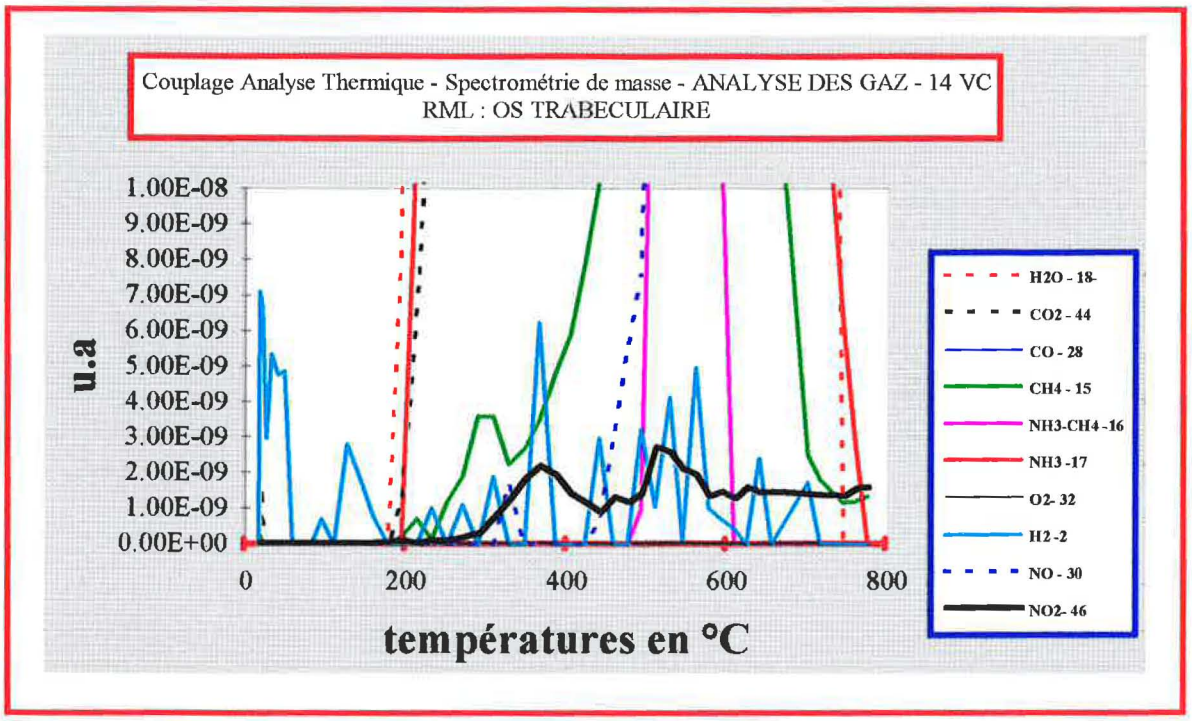


figure 75 b

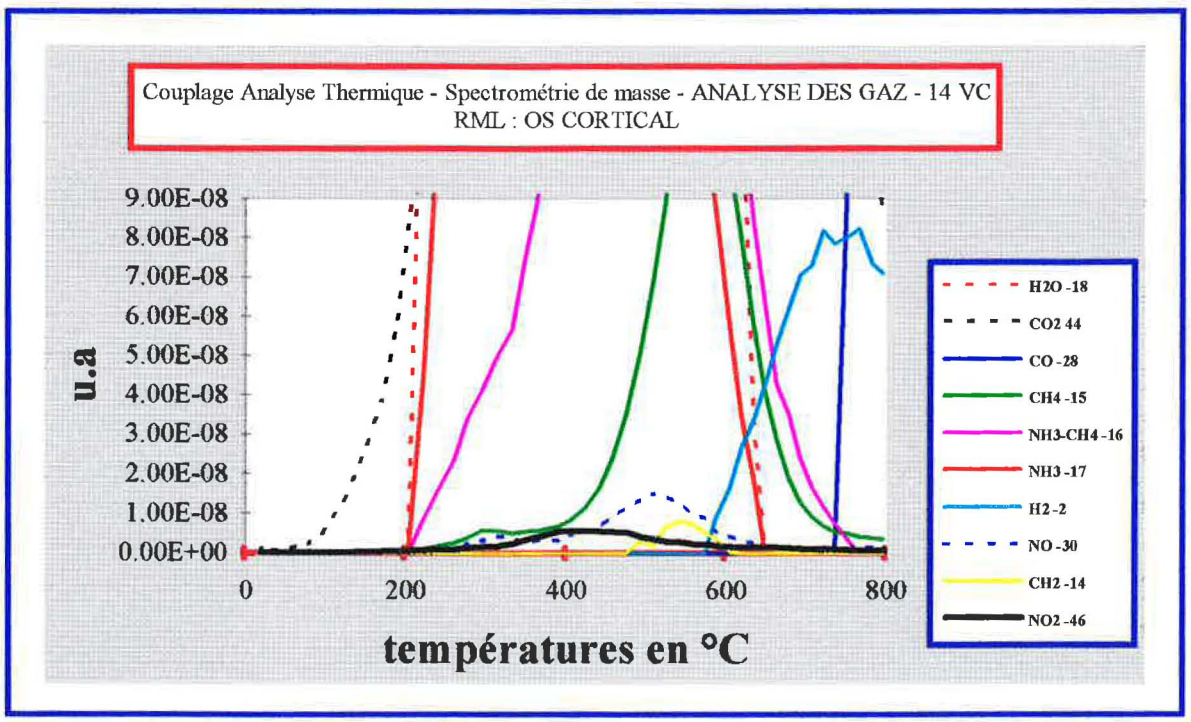


figure 76 b

COMMENTAIRES :

Cette analyse est très riche en renseignements. Une étude, en relation avec les biochimistes devrait permettre une analyse plus fine.

Nos observations porteront sur :

⇒ la présence confirmée du monoxyde de carbone dans l'os cortical **(figure 76)**

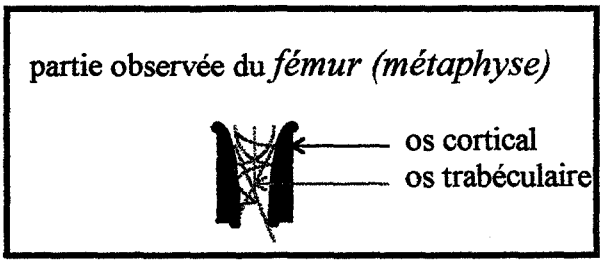
⇒ la présence de dioxyde de carbone confirmé pour l'os cortical dès la montée de température. Cette présence, pour l'os trabéculaire, est remarquée juste en dessous de 200°C **(figures 75 b et 76 b).**

En couplage FTIR-ATG le dioxyde de carbone était présent en-dessous de 100°C pour l'os cortical *et* l'os trabéculaire **(figures 64, 66, 72, 73, 74).**

ELLIOT *(4)*, signale que certains auteurs ont trouvé la présence de dioxyde de carbone avant 100° C et que d'autres n'ont signalé sa présence qu'à partir de 180° C.

Dans le cas de notre travail, *plusieurs hypothèses* peuvent être formulées :

- la technique de couplage ATG-FTIR *est plus sensible* pour les départs de dioxyde de carbone que la technique de couplage ATG-spectrométrie de masse. En effet, Il faut signaler que l'échantillonnage, est le même pour les deux couplages puisque ce sont toujours les métaphyses du fémur qui sont observées. *Les masses soumises à l'analyse sont très différentes pour l'os cortical et l'os trabéculaire (de l'ordre de 2 à 3 mg pour la prise d'essai pour l'os trabéculaire contre une quinzaine de mg pour l'os cortical soit environ 5 fois plus).*



En conséquence, une bonne sensibilité en ATG-FTIR (coefficient d'absorption très élevé) permet d'observer le départ du dioxyde de carbone adsorbé *sur les faibles masses.*

- L'os trabéculaire observé en ATG-spectrométrie de masse provient du rat appartenant au même groupe que celui observé en ATG-FTIR **(figure 72)** où la présence de dioxyde de carbone avant 100 °C est incontestable. Il n'est pas exclu que les deux témoins diffèrent dans la quantité de dioxyde de carbone qui est mise en évidence à basse température.

Le fait d'observer ou non des différences dans les températures de dégagement du dioxyde de carbone serait une mesure de l'adsorption de surface, à un moment donné et sous des conditions données. Le facteur vieillissement de l'échantillon n'a pas été pris en compte et les analyses en ATG-spectrométrie de masse sont ultérieures à celles en ATG-FTIR.

⇒ le dégagement du dioxyde d'azote (non suivi en ATG-FTIR) mis en évidence sur **les figures 75 b et 76 b**. Il est intéressant de noter à ce sujet une similitude dans ces départs avec les départs du dioxyde de carbone **(figure 75 et 76).** Les allures des courbes paraissant significatives.

⇒ la présence de l'hydrogène dans l'os cortical peu avant 600°C.

⇒ l'absence dans l'os cortical et l'os trabéculaire de gaz oxygène.

En conclusion, un couplage de ce type permet d'avoir une très bonne appréhension du comportement de l'os soumis à un traitement thermique sous une atmosphère donnée et contrôlée. Il pourrait être un excellent support dans la compréhension et la caractérisation de l'os.

5-2. L'ANALYSE THERMOGRAVIMETRIQUE

Les deux couplages ATG-spectrométrie infrarouge et ATG-spectrométrie de masse nous permettent de *suivre les* pertes de masse enregistrées au cours de la montée de température du four. Dans cette étude, nous ne pouvons pas relier *quantitativement* le départ d'un gaz particulier à une perte de masse car, d'une part, ces départs concernent toujours plusieurs gaz en même temps et que, d'autre part, nous n'avons pas effectué d'étalonnage de la réponse des spectromètres.

Le matériel est présenté au chapitre II pages 29-33.

Nous rappelons que l'os trabéculaire et l'os cortical n'ont subi aucun broyage et que les masses de l'os trabéculaire sont environ 5 fois plus faibles que celles de l'os cortical. La **figure 77** et la **figure 78** concernent les thermogrammes de l'os trabéculaire et de l'os cortical de rats ayant participé au vol spatial. Nous n'avons pas observé de différences significatives concernant les différents groupes. Toutefois la perte de masse après 620 °C est quelquefois absente. **La figure 79** concerne l'os trabéculaire du rat 25 SCRML (14 jours de simulation + 14 jours de récupération) cette perte est relativement importante alors que chez l'os trabéculalire du rat 29 VCRML (14 jours de vol spatial + 14 jours de récupération) elle est absente. D'une manière générale, sur les échantillons observés cette perte de masse après 620° C est soit inexistante, soit très faible.

Les principales pertes de masses se situent vers 80°C, 250°C et 330°C pour l'os trabéculaire alors que pour l'os cortical ells se situent vers 120° C et 350 °C.

La masse et la compacité des échantillons non broyés sont très différentes : 3 mg environ sous forme dispersée pour l'échantillon d'os trabéculaire et une quinzaine de mg sous forme très compacte pour l'os cortical. Nous avons vérifié l'effet de ces deux paramètres d'une part en abrasant l'os cortical afin d'obtenir une poudre sous une forme analogue à celle de l'os trabéculaire et d'autre part, en réduisant sa masse. Les résultats, présentés en annexe, permettent de mettre en évidence des variations des températures des pertes de masse qui dépendent de ces paramètres expérimentaux.

OS CORTICAL				
RATS	**MASSES mg**	**PERTE 1 %**	**PERTE 2 %**	**TOTAL %**
12 VC RML vivarium	15,2	11,6	29,8	41,4
17 F RO vol	14,6	17,0	28,9	45,9
29 F RML vol + récupération	15,0	18,0	30,5	48,5

OS TRABECULAIRE				
RATS	**MASSES mg**	**PERTE 1 %**	**PERTE 2 %**	**TOTAL %**
6 SC RO simulation		4,8	45,0	49,8
9 SC RO simulation		7,8	51,0	58,8
17 F RO vol	2,7 à 3,0 mg	8,2	49,7	57,9
20 F RO vol		7,5	64,3	71,8
25 SC RML simulation + récupération		4,6	57,8	62,4
29 F RML vol + récupération		7,1	54,2	61,3

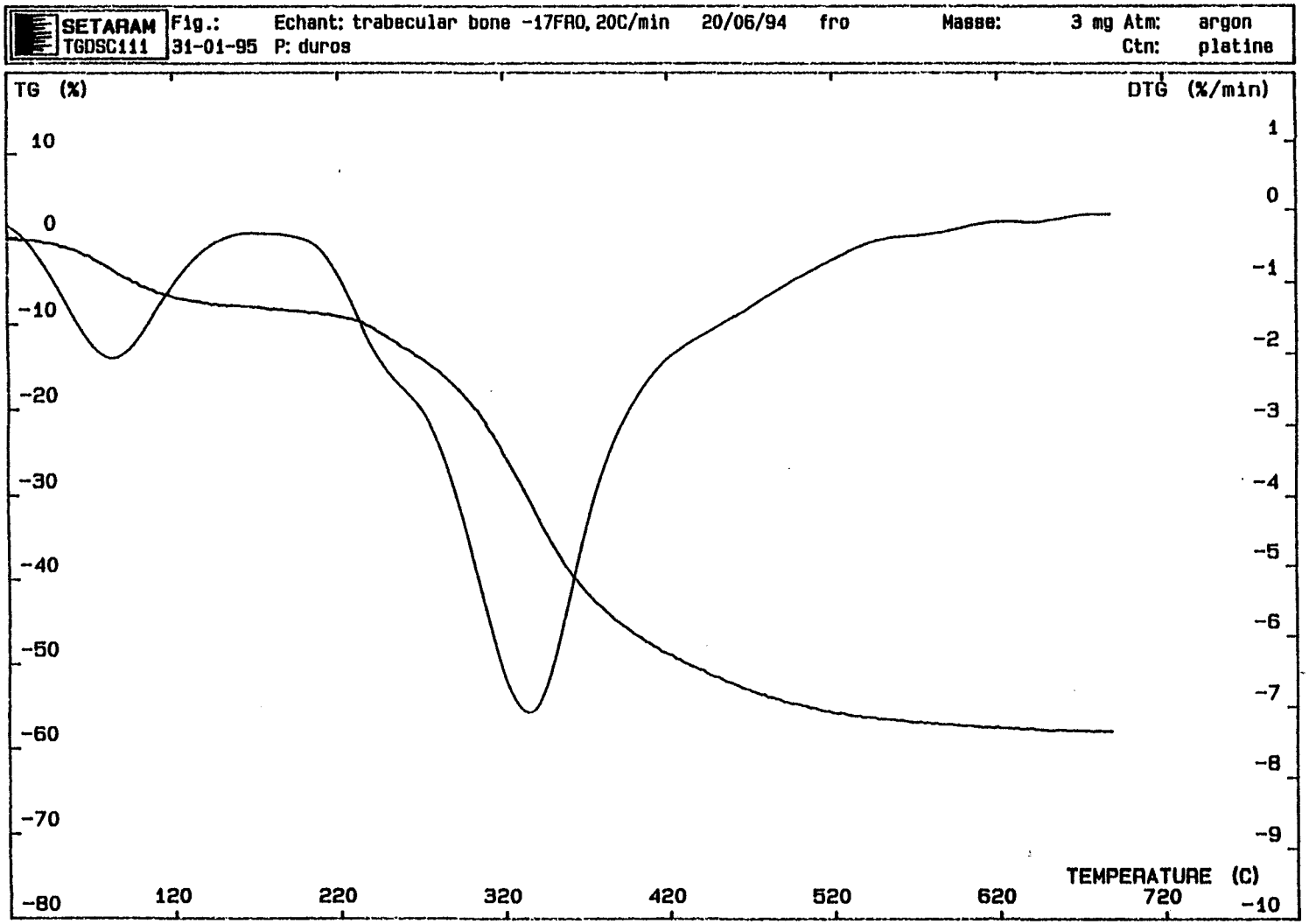

SETARAM
TGDSC111
Fig.: Echant: trabecular bone -17FRO, 20C/min 20/06/94 fro Masse: 3 mg Atm: argon
31-01-95 P: duros Ctn: platine
TG (%)
DTG (%/min)
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
-8
-9
-10
120
220
320
420
520
620
720
TEMPERATURE (C)

figure 77

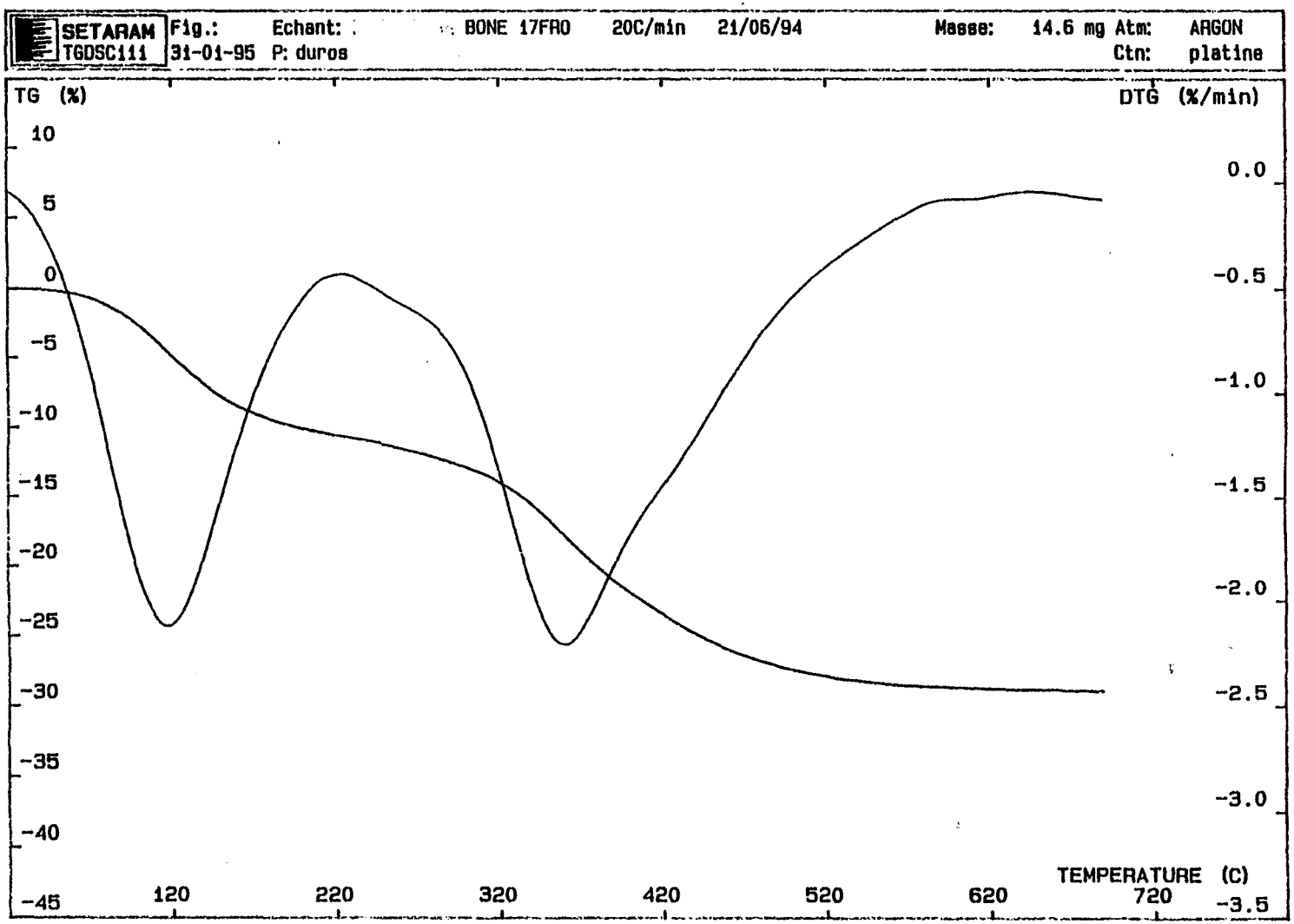

SETARAM
TGDSC111
Fig.:
31-01-95
Echant:
P: duros
BONE 17FRO
20C/min
21/06/94
Masse:
14.6 mg
Atm:
ARGON
Ctn:
platine
TG (%)
DTG (%/min)
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-35
-40
-45
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
-3.5
120
220
320
420
520
620
720
TEMPERATURE (C)

figure 78

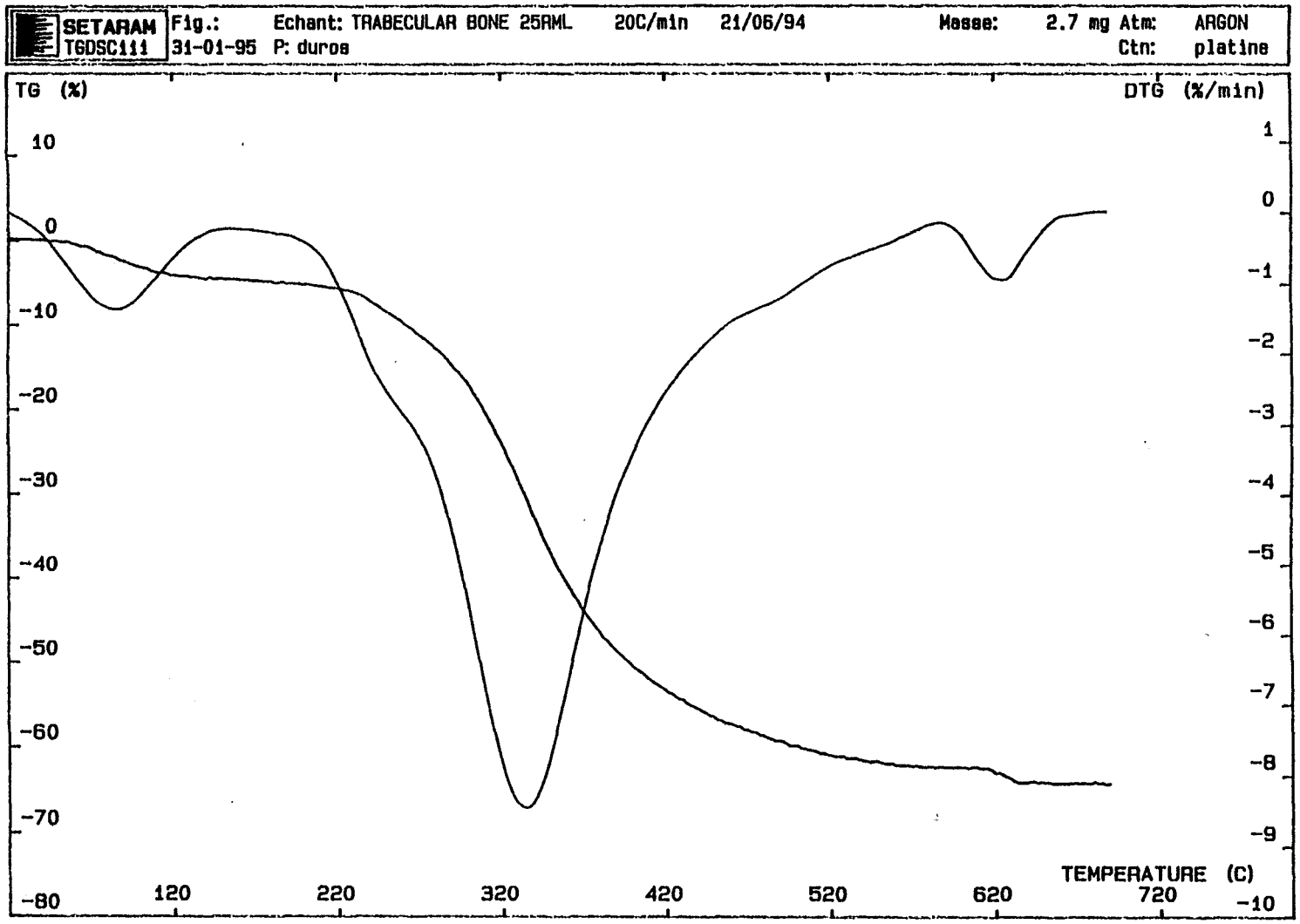

SETARAM
T6DSC111
Fig.:
31-01-95
Echant: TRABECULAR BONE 25RML
P: duros
20C/min
21/06/94
Masse:
2.7 mg
Atm:
ARGON
Ctn:
platine
TG (%)
DTG (%/min)
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
-8
-9
-10
120
220
320
420
520
620
720
TEMPERATURE (C)

figure 79

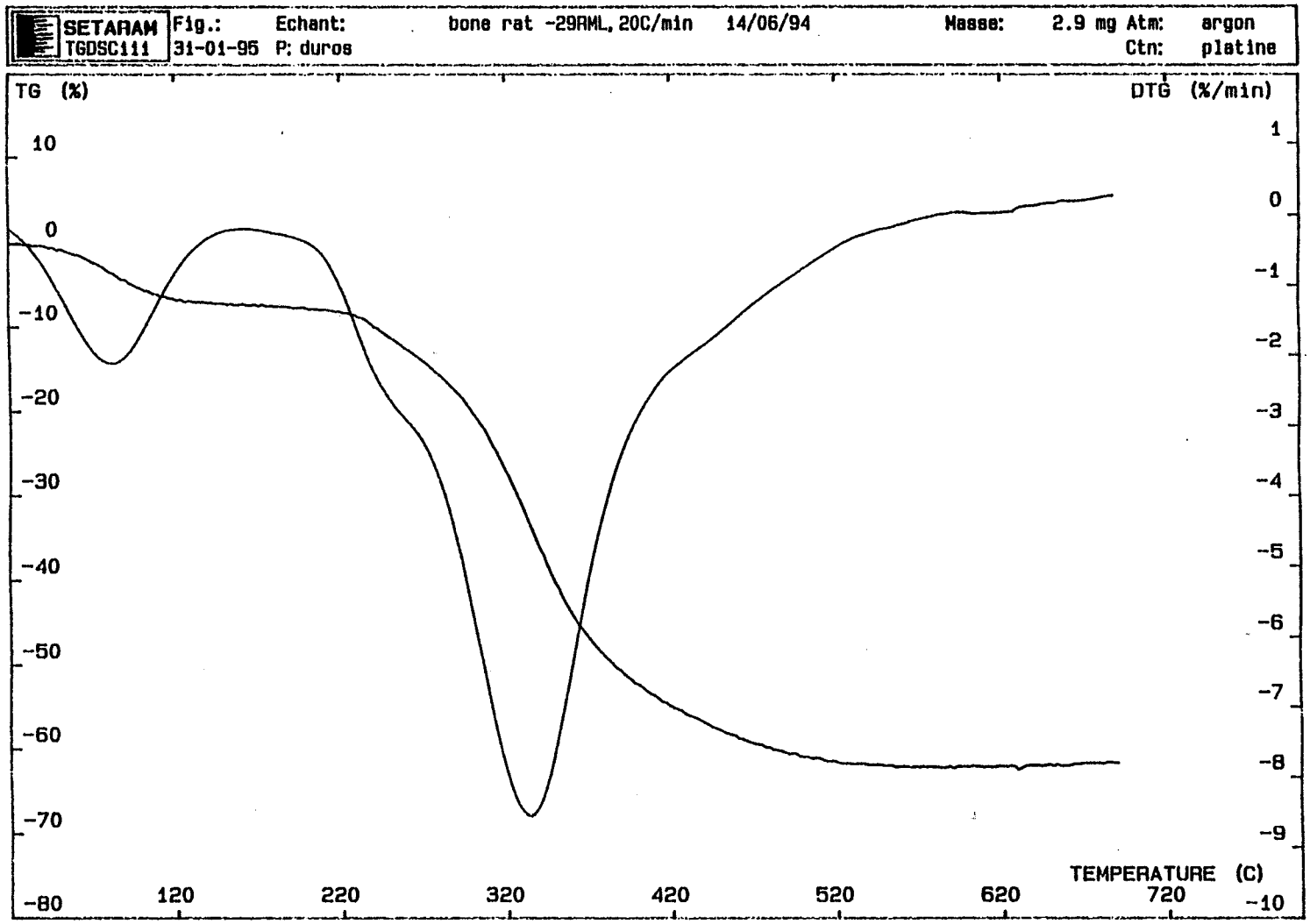

SETARAM
TGDSC111
Fig.:
31-01-95
Echant:
P: duros
bone rat -29RML, 20C/min
14/06/94
Masse:
2.9 mg
Atm:
argon
Ctn:
platine
TG (%)
DTG (%/min)
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
-8
-9
-10
120
220
320
420
520
620
720
TEMPERATURE (C)

figure 80

5-3. L'ANALYSE PAR DIFFRACTION RX

Tous les matériaux de référence préparés ainsi que ceux des laboratoires MERCK, ALDRICH et CARLO ERBA ont été contrôlés par diffraction RX. Nous présentons en annexe le diffractogramme de l'OCP : l'acquisition a été effectuée avec un appareil SIEMENS D5000.

Des diffractogrammes d'os trabéculaire de rats, simplement étalés sur le porte échantillon n'ont pas présenté des informations intéressantes : raies très étalées et beaucoup de bruit (cristallites de petites tailles). Les durées d'acquisition étaient vraisemblablement trop courtes (inférieures à 5 heures). Généralement, pour le tracé d'un spectre acceptable sur un tissu osseux, il est nécessaire de procéder à l'acquisition avec un temps plus long (généralement supérieur à 12 heures). Nous n'avons pas poursuivi cette étude car elle sortait du cadre de notre travail.

chapitre 4

IV - COMMENTAIRES et CONCLUSIONS

1 - LA MECONNAISSANCE DU TISSU OSSEUX

1-1. LES DIFFERENTES SUBSTITUTIONS DU MINERAL

Il est important de comprendre le comportement du minéral sous les conditions pathologiques et physiologiques. La connaissance détaillée de la composition et de la solubilité des tissus calcifiés est toujours en cours d'études. On trouve dans la littérature que le composé minéral ressemble beaucoup à de l'hydroxyapatite non stoechiométrique.

L'os a généralement un rapport Ca/P inférieur au rapport théorique Ca/P de l'hydroxyapatite. Plusieurs hypothèses ont été émises que rapportent MEYER J.L et FOWLER B. O. *(141)*.

- Groupements hydroxydes théoriques.
- Défauts d'ions calcium compensés électriquement par la présence de deux ions HPO_4^{2-} dans le réseau. *(142).(143) (144)*

$\mathbf{Ca_{10-x}(HPO_4)_{2x}(PO_4)_{6-2x}(OH)_2}$ $\quad$ $\mathbf{0 < x < 2}$

- Défauts d'ions calcium et hydroxydes. L'ion HPO_4^{2-} entrant dans le réseau doit nécessairement être couplé avec la perte de l'ion calcium et de l'ion hydroxyde. *(145) (146) (147)*

$\mathbf{Ca_{10-x}(HPO_4)_{x}(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}}$ $\quad$ $\mathbf{0 < x < 2}$

- Maintien de l'électroneutralité par combinaison :
- addition d'un proton par défaut de calcium et d'hydroxyde
- absence de deux hydroxydes par défaut d'ion calcium *(147)*

$\mathbf{Ca_{10-x-y}(HPO_4)_{x}(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x-2y}}$ $\quad$ $\mathbf{0 < x < 2}$ $\quad$ $\mathbf{y = 1-x/2}$

- Cas de l'apatite carbonatée : *(147)*
- substitution des ions CO_3^{2-} par HPO_4^{2-}.

$\mathbf{Ca_{10-x-y}(HPO_4, CO_3)_{x}(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x-2y}}$ $\quad$ $\mathbf{0 < x < 2}$ $\quad$ $\mathbf{y = 1-x/2}$

- Cas de 2) dans le cas où Ca/P est compris entre 1,50 et 1,67 *(148) (150)*

$\mathbf{Ca_{10-x}(HPO_4)_{x}(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}}$ $\quad$ $\mathbf{0 < x < 1}$

- Dans le cas où Ca/P est compris entre 1,40 et 1,50 *(149) (151)*

$\mathbf{Ca_{9-x}(HPO_4)_{1+2x}(PO_4)_{5-2x}(OH)}$ $\quad$ $\mathbf{0 < x < 1}$

Dès 1957, des auteurs *(152 et 153)* proposèrent la solution suivante : les défauts en ion calcium provenaient des couches alternées d'OCP (similitude de structure) et de HAP. La formule chimique ressemblant à (2). Cette hypothèse n'est actuellement plus retenue.

Une étude *(141)* chimique complète (hydroxyde, calcium, phosphate, hydrogéno phosphate et carbonate) d'HAP non stoechiométrique avec des rapports Ca/P variant de 1,40 à 1,62 a été réalisée en tenant compte des différentes compositions énumérées ci-dessus. Des teneurs en hydroxyde entre 0 et 1,13 par unité de cellule de l'hydroxyapatite étaient obtenues par les conditions expérimentales. La formule représentant le mieux les données expérimentales était : $Ca_{10-x-y}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x-2y}$ qui décrit deux types de défauts calcium dans le réseau. Le premier ou type X est la perte d'un hydroxyde et de l'addition d'un ion hydrogène. Il semble dépendre des conditions de préparation des précipités. Le deuxième ou type Y est compensé électriquement par deux défauts d'hydroxyde et semble insensible aux conditions d'environnement avec en moyenne 0,5 défaut calcium par unité de cellule.

1-2. LA SOLUBILITE ET LE PRODUIT DE SOLUBILITE DES PHOSPHATES DE CALCIUM

Nous repenons les résultats de différents auteurs concernant les études de solubilité et résumés par F.C.M DRIESSENS *(154-155)*.

NOTATION	FORMULE	pKs	NOM MINERAL
DCP	$Ca\,HPO_4$	6,90	monétite
DCPD	$Ca\,HPO_4\,,\,2H_2O$	6.59	brushite
OCP	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_6,\,5H_2O$	68,6 (1)	
WH	$Ca_{10}(HPO_4)(PO_4)_6$	81,7 (1)	whitlockite
OHA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	117,2	hydroxyapatite
DOHA	$Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH)$	85,1 (1)	défective hydroxyapatite

(1) estimé

Les produits de solubilité de $Ca\,HPO_4$ furent déterminés par Mc DOWEL et al. (1971), ceux de $CaHPO_4$, $2H_2O$ par GREGORY et al.. le produit de solubilité de la Whitlockite est estimé à partir des travaux de MEYER et EANES (1978). De la même manière le produit de solubilité de l'OCP fut estimé par Moreno et al. (1960).

De nombreux auteurs ont recherché la solubilité de l'OHA. Dépendant du mode de préparation, le logarithme négatif du produit de solubilité (pK) peut varier de 98 à 118 (cette variation est 10 fois plus grande que celle que pourraient produire des effets d'énergie de surface dûs à la taille des particules). Les meilleures reproductibilités furent obtenues avec un reflux ou avec des échantillons soigneusements lavés. Citons les auteurs : CLARK (1955) , WIER et al. (1971), AVNIMELECH et al. (1973), CHUONG (1973) et VERBEECK(1980). La moyenne des différents pK est de 117,2.

Dans le calcul des ces produits de solubilité les constantes de dissociation sont prises en compte. La teneur en ions calcium dans la solution aqueuse est une mesure de la solubilité de ces phosphates de calcium.

On observe que la solubilité augmente d'un facteur entre 6 et 10 lorsque le pH varie d'une unité dans un intervalle donné : ceci est principalement dû au fait que l'acide orthophosphorique est un acide faible. Par dissolution les ions PO_4^{3-} sont combinés progressivement avec les protons lorsque le pH diminue. Les diagrammes de solubilité mettent en évidence ces différents changements.

L'apatite est la phase stable dans l'intervalle pH > 4,2 : pK_{OHA} = 117,2. Si les échantillons de phosphates de calcium ne sont pas préparés dans les conditions mentionnées ci-dessus avant l'équilibre en solution aqueuse, les valeurs trouvées pour le logarithme négatif du produit ionique de l'apatite, qui est donné par :

$$pI_{OHA} = 10\,pCa + 6\,pPO_4 + 2\,pOH$$

peuvent fortement varier de 117,2 même lorsque la structure du solide semble être celle d'une apatite pure en diffraction RX. Ainsi la différence :

$$pI_{OHA} - pK_{OHA}$$

est une mesure pour la déviation à partir de l'équilibre réel dans le système CaO-P_2O_5-H_2O.

Le diagramme représenté ci-dessous illustre les déviations à partir de l'équilibre. pI_{OHA} est donné en fonction du pH. Les courbes ne sont pas droites sauf pour celle de l'OHA mais présentent une très légère courbure. MX représente un électolyte indifférent comprenant des ions M^+ et X^- n'affectant pas le solide et rajouté afin de maintenir le système dans l'électroneutralité. La courbe pour la whitlockite est en-dessous de la zone tracée et se situe pI_{OHA} 91 à pH 7 et pI_{OHA} 97 à pH 5. La courbe pour $CaHPO_4$ n'est pas donnée car cette phase est rarement formée dans les systèmes aqueux.

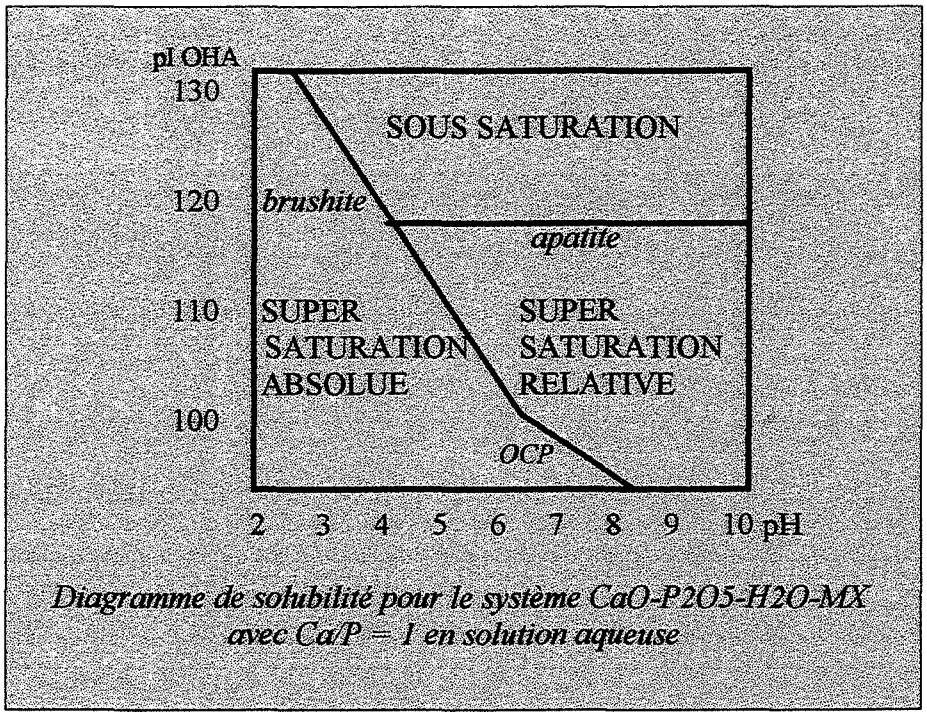


Diagramme de solubilité pour le système CaO-P2O5-H2O-MX avec Ca/P = 1 en solution aqueuse

Dans les systèmes phosphate de calcium sous des conditions métastables les déviations a l'équilibre réel se situent pour la plupart dans la zone de supersaturation relative. Les limites représentées par les traits du DCPD et de l'OCP de cette zone dépendent du rapport Ca/P en phase aqueuse.

F.C.M DRIESSENS fait remarquer que, *sous de telles conditions métastables, on ne sait pas si le comportement de la solubilité est contrôlé par une très petite quantité d'une seconde phase solide ou par un très fin revêtement de particules, en surface de la phase principale apatitique, d'une autre phase de phosphate de calcium qui ne pourrait pas être détectée par des moyens physiques (155).*

Les effets sur la solubilité de quelques éléments mineurs contenus dans le tissu osseux ont été étudiés (strontium, fluor *(131-132)*). Ces ions provoquent non seulement des substitutions hétéroioniques dans le réseau cristallin de la phase apatitique mais aussi d'importantes modifications qui affectent la déminéralisation *in vitro* et *in vivo* du tissu osseux.

1-3. LA NUCLEATION ET LA CROISSANCE

La connaissance des mécanismes qui contrôlent la nucléation et la croissance des phosphates de calcium des systèmes biologiques est encore très limitée. De nombreux facteurs interviennent pour la régulation de la biominéralisation :

- la sécrétion des composés organiques

- le contrôle par l'intermédiaire des cellules de la composition ionique de la phase liquide enveloppant le minéral formé

- la présence de différents régulateurs affectant les cinétiques de précipitation.

Par exemple, les femmes ostéoporotiques présentent une plus forte dispersion de la taille des particules. Le magnésium exerce son action comme un inhibiteur dans la nucléation et la croissance de l'apatite et de ses précurseurs intermédiaires. On rencontre un taux anormalement élevé de magnésium dans certaines pathologies infantiles.

L'analyse a montre la très grande diversité des éléments chimiques qui se trouvent dans le tissu osseux. Il est évident que beaucoup de travail reste à effectuer pour connaitre toutes les incidences de tel ou tel élément sur les mécanismes de nucléation et de croissance.

1-4. LA CARACTERISATION

Dans ce travail, nous avons observé la présence de fortes absorptions dans la zone minérale et organique que nous n'avons pas été en mesure d'identifier. L'acquisition en réflexion diffuse, privilégiant la surface, a permis cette observation. Comme nous le verrons plus loin, d'autres acquisitions en spectrométrie infrarouge devraient peut-être, dans l'avenir, faciliter l'observation plus fine de cette surface avant de procéder à une possible identification de composés et, en conséquence de faire *un pas de plus* vers la compréhension du phénomène complexe qu'est la biominéralisation. Cette compréhension peut se faire :

⇒ en travaillant sur des matériaux synthétiques, pour l'identification des composés et pour la compréhension de leurs comportements lorsqu'ils sont soumis à diverses conditions expérimentales.

⇒ en observant le biomatériau *avec le minimum d'altération*

⇒ en essayant de pratiquer des analogies avec les matériaux synthétiques.

⇒ en analysant les changements qui s'opèrent sur le tissu osseux lorsque les parmamètres *in vivo* varient (apesanteur, pathologie ...).

⇒ en conjuguant les efforts de compréhension des différentes observations effectuées par les médecins, les biologistes et les chimistes, pour essayer de dégager les différents mécanismes de cette biominéralisation.

2 - PERSPECTIVES D'APPLICATIONS DE LA SPECTROMETRIE INFRAROUGE DANS LA CARACTERISATION DES TISSUS CALCIFIES

2-1. LES MODES DE TRANSMISSION

2-1-1. LE PASTILLAGE

L'observation en mode transmission, par exemple sous forme de pastille de bromure de potassium, est toujours très utilisée. Pour des matériaux synthétiques, *elle reste la seule qui puisse aborder la quantification du solide facilement sans trop d'erreurs*. Cette méthode s'applique particulièrement bien aux matériaux ne souffrant pas ni d'une homogénéisation, ni d'un broyage (129), ni d'une compression ni d'une interaction chimique avec le bromure de potassium ni d'un éventuel étuvage.

La théorie dans le domaine de l'optique montre que les fréquences sont dépendantes de la taille des particules et du milieu (y compris lorsque la poudre est broyée dans un halogénure tel que le bromure de potassium à des fins de pastillage). D'après certains auteurs, les techniques de préparation utilisant des mélanges avec du bromure de potassium sont suspectes lorsqu'elle sont appliquées à des matériaux fortement ioniques (84).

2-1-2. LES EMULSIONS

L'échantillon est broyé et mélangé à certains liquides par exemple l'huile de paraffine (nujol) ou du fluoroluble. Les bandes de ces composés apparaissent sur le spectre. Toutefois ces observations sont intéressantes pour des matériaux craignant la compression ou le vide. De plus, elles permettent de mettre en évidence, en comparaison avec la technique de pastillage, certaines formes de composés (111). L observation à l'abri de l'air n'est quelquefois pas négligeable. Dans le cas des tissus calcifiés, cette technique n'est pas utilisée (à notre connaissance).

2-1-3. LES FILMS ET LES DEPOTS

Les films ou dépôts ont toujours été très utilisés avec les spectromètres infrarouges dispersifs. Il s'agit, pour les films, de trouver le bon solvant de l'échantillon, de faire évaporer ce dernier et d'acquérir un spectre sur le film obtenu. Cette méthode est toujours utilisé *en direct* en mode transmission dans le millieu industriel (film plastique transparent, colle...).

Cette méthode convient particulièrement bien pour étudier des substances biologiques en très petite quantité lorsqu'elles sont dans un milieu liquide qui peut facilement s'évaporer. L'inconvénient, en mode de transmission, provient de la manipulation du film

s'il est trop fin. Le mode ATR, que nous allons décrire, présente une grande souplesse d'utilisation.

Les dépôts sont particulièrement intéressants dans certains cas. Par exemple, l'observation des silicates (minéral dont la structure est en couches) permet une meilleure approche de cette structure s'ils sont déposés. En effet, ces matériaux prennent une orientation avec leur axe c normal au plan du dépôt. En conséquence différents types de liaisons peuvent être mis en évidence. Ce type d'observation actuellement relativement peu connu des utilisateurs, a permis à HUNT et al. en 1950 d'étudier un grand nombre de minéraux et de sels minéraux (133). Récemment, l'orientation des matériaux biologiques, présente un intérêt pour l'observation au moyen de nouvelles techniques infrarouges que nous présenterons plus loin.

2-2. LES MODES DE REFLEXION

Les modes de réflexion, souvent prohibés avec les spectrophotomètres dispersifs par manque de précision (la technologie des appareils dispersifs ne le permettait pas), ont pris ces dernières années un essor et une diversité considérables. Ils donnent actuellement un grand renouveau à la technique de spectrométrie infrarouge. Les observations sur des supports parfois sophistiqués permettent une appréhension des comportements de certains composés de manière fine et originale.

2-2-1. LA REFEXION DIFFUSE

Dans ce travail, nous avons exposé ce mode d'acquisition. Les applications dans le cadre des tissus calcifiés tendent actuellement à se généraliser dans le domaine de la paléontologie (101).

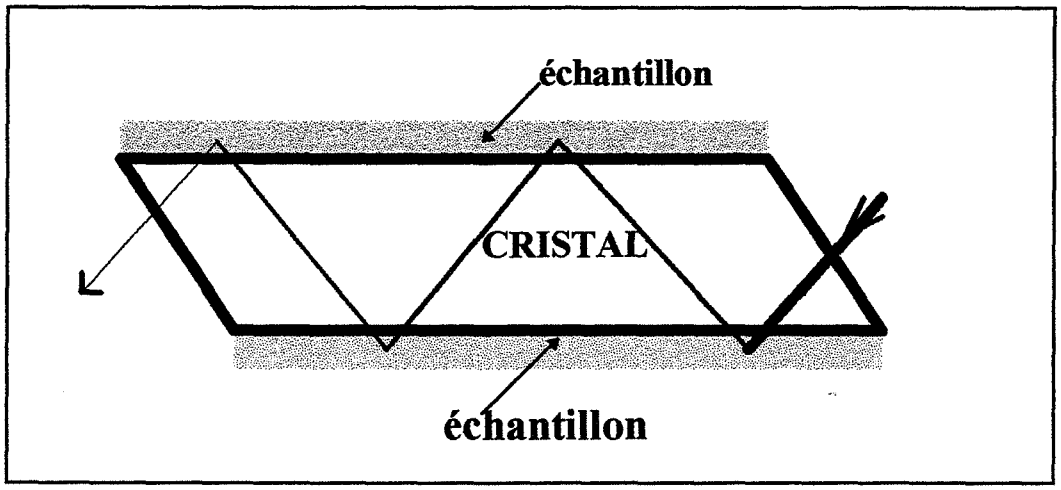
Récemment la technique d'observation du minéral synthétique en mode réflexion diffuse, a pemis de mettre en évidence différentes substitutions dans les apatites *(134-135)*.

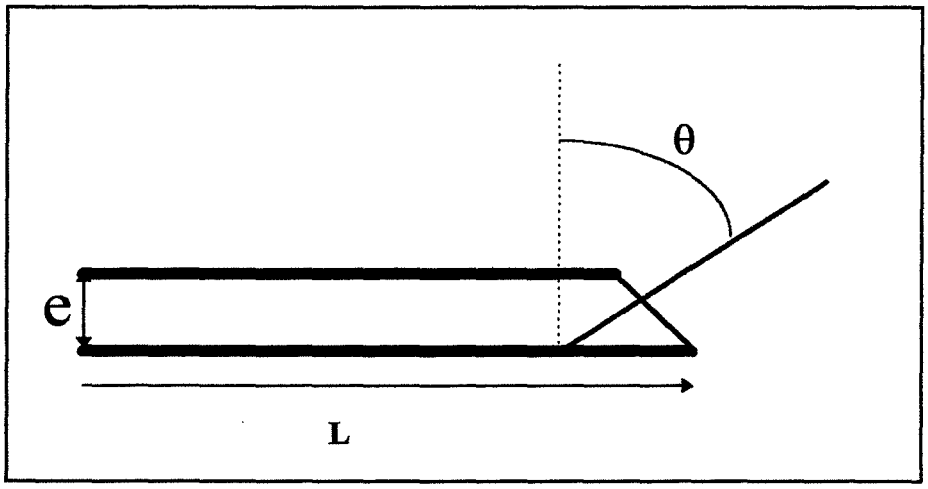
2-2-2. LA REFLEXION TOTALE ATTENUEE (ATR)

2-2-2-1. éléments de théorie

La réflexion interne totale se produit lorsqu'un faisceau de lumière pénètre dans un cristal avec un angle d'incidence, à l'interface de l'échantillon et du cristal, plus grand que l'angle critique pour la réflexion (qui dépend des indices de réfraction du cristal et de l'échantillon). Le faisceau pénètre une fraction de longueur d'onde (quelques µm) dans l'échantillon au-delà de la surface réfléchissante. Des absorptions sélectives en résultent. Enfin le faisceau *atténué* sort par la face de sortie.

L'échantillon est déposé (film, poudre...) sur les deux faces d'un monocristal avec un fort index de réfraction (KRS-5 ou germanium).





Pour un spectre de réflexion interne plusieurs paramètres sont pris en considération :

→ le coefficient d'absorption a
→ la surface de contact
→ l'efficacité du contact
→ le nombre théorique de réflexions dans le cristal n
→ la profondeur de pénétration d.

Le nombre théorique de réflexion n est donné par :

$$n = \frac{L}{e}\cos\theta$$

L = longueur du cristal
e = épaisseur
θ = angle d'incidence

On démontre aussi que l'épaisseur efficace b_{eff} est donné en fonction du nombre de réflexions effectives N et de la profondeur de pénétration d par :

$$b_{eff} = N \times d$$

Certains facteurs sont fonction de la longueur d'onde λ : la profondeur de pénétration d augmente quand λ croit ce qui affecte par conséquent l'efficacité de contact (dans le cas par exemple d'un échantillon structuré).

PROFONDEUR DE PENETRATION :

Les facteurs dont dépend la profondeur de pénétration d sont :

1) la longueur d'onde de la radiation (dans le cristal) : proportionnelle
2) l'angle d'incidence θ : inversement proportionnelle
3) l'état de polarisation de la radiation :
   incidence = plan parallèle ou perpendiculaire (parallèle > perpendiculaire)
4) l'indice de réfraction du cristal n_1
5) l'indice de réfraction de l'échantillon n_2 : inversement proportionnel à n_2/n_1
6) le coefficient d'absorption de l'échantillon a : directement proportionnel)
7) l'épaisseur de l'échantillon t (si t < d) : directement proportionnel

L'équation suivante donne d en fonction des facteurs 1 - 2 - 4 et 5.

$$d = \frac{N_{2/1}\ (\lambda / n_1) \cos\theta}{(1 - n^2_{2/1})\ (\sin^2\theta - n^2_{2/1})\ 1/2}$$

$n_{2/1} = n_1 / n_2$ = indice de réfraction relatif
λ/n_1 = longueur d'onde de la radiation dans le cristal.

Cette équation permet de calculer la profondeur de pénétration en fonction de la longueur d'onde pour plusieurs types de cristaux et à différents angles d'incidence.

2-2-2-2. Applications de l'ATR

Certains accessoires d'ATR se présentent horizontalement et le cristal d'observation affleure la partie supérieure du spectromètre. En conséquence, l'échantillon peut-être « externe » au spectromètre ce qui présente un certain nombre d'avantages :

On peut acquérir un spectre même en milieu aqueux (dont les larges bandes d'absorption de l'eau seront déduites du spectre) sans détériorer la partie appareillage. Il est toutefois recommandé de ne pas travailler dans les zones d'absorption de l'eau ce qui

n'aurait aucun sens. Par contre, le cristal, s'il est choisi convenablement va permettre de devenir un support de film ou de dépôt que l'on aura obtenu de la même manière que pour les acquisitions en mode transmission.

Cette possibilité est intéressante notamment pour suivre des transformations de substances au cours du temps. On enregistre, par exemple, un spectre à des temps déterminés et on suit ainsi une cinétique d'évolution du produit. De plus, le fait d'avoir accès à l'échantillon sans pertuber l'acquisition peut permettre des ajouts *« de réactifs »* et observer certains phénomènes (diffusion, réaction chimique etc...).

Cette dernière possibilité présente, à notre avis, un excellent moyen d'étude pour l'avenir dans la coopération d'investigations des biologistes et des physiciens. Le cristal d'observation est démontable et, en conséquence, facilement utilisable comme support biologique (nettoyage, préparations etc...) pour suivre des changements et des modifications de substances.

Le contact de l'échantillon et du cristal est impératif. Extérieurement, avec un système ATR horizontal, une simple pression permet d'établir ce contact. Certains auteurs ont utilisé cette technique pour mettre en évidence certains types de collagène *in vivo*.(136). L'observation des tissu mous est rendue possible sans mise en forme de l'échantillon. Il serait intéressant de relier parfois la pertubation de l'os et son environnement dans certains types de pathologies. L'étude d'un muscle ou ligament pourrait être possible avec l'ATR (en exerçant une pression pour maintenir un contact avec la surface du cristal).

Il faut noter que ce domaine de recherches est en plein essor d'une part avec le choix du cristal afin d'améliorer les contacts de surface et d'autre part, pour les domaines d'investigations concernés (137).

Il est maintenant possible d'acquérir un spectre de réfexion *externe* sur une grande variété de substances diélectriques et d'étudier la structure de films organiques fins sur des substrats. Ce développement est exploité pour l'étude de monocouches Langmuir -films de substances insolubles dispersées de l'épaisseur d'une simple molécule à l'interface air/eau (139)-en utilisant les propriétés de réfexion de la phase eau (140). Cette méthodologie possède une signification particulière pour les recherches biophysiques puisque beaucoup de substances biochimiques (phospholipides, proteines ...) forment des monocouches Langmuir et manifestent des propriétés biophysiques caractéristiques dans de telles monocouches. Ces substances se trouvent présentes dans les tissus osseux.

Récemment en 1995, des auteurs (138) ont développé un appareillage permettant l'acquisition en ATIR (polarisé) de spectres infrarouges de films monocouches *in situ* à l'interface *lipide/eau* (L/W). Ce film monocouche est appliqué à la surface traitée d'un cristal de germanium trapézéoidale qui est immergé dans une certaine phase. Le système est connu sous le nom de Langmuir-Blodgett. Cette approche présente plusieurs avantages sur les films monocouches air/eau (A/W) des techniques en réflexion externe :

⇒ un signal obtenu plus élevé (meilleur rapport signal/bruit)
⇒ la souplesse par rapport à la nature chimique de la surface
⇒ la possibilité d'utiliser des méthodes de soustractions spectrales « standards » pour compenser l'absorption de la phase aqueuse.

La sensibilité accrue de cette méthode facilite l'étude *in situ* de l'interaction de peptides avec les surfaces des membranes lipidiques hydratées.

Le système Langmuir-Blodgett est construit à partir d'un simple bloc de téflon. Le système, est équipé d'une électro-balance Cahn pour mesurer la pression de surface.

Ces nouvelles techniques « accessoires » de la spectométrie infrarouge semblent très prometteuses pour la caractérisation des matériaux biologiques.

3 - L'OS ET L'ECONOMIE

3-1. LE COÛT DE LA SANTE

Un exemple : l'ostéoporose.

L'ostéoporose touche majoritairement les femmes après la ménopause. Elle se caractérise par une diminution de la densité osseuse et une fragilisation des os. La masse osseuse apparaît déterminée par des interactions complexes entre de nombreux facteurs héréditaires, hormonaux, nutritionnels et environnementaux. Ceci laisse supposer l'intervention de plusieurs gènes dans le déterminisme et l'évolution de l'ostéoporose. Des travaux australiens laissent également apparaitre la possibilité de mettre au point un test qui, en permettant de détecter les sujets à risques, autoriserait la définition de stratégies préventives de l'ostéoporose. Les chercheurs ont d'ailleurs déposé un brevet portant sur le développement d'un tel test génétique (*Nature* 367, 284-287)

En 1991, la revue Genetic Technology News (11-5-11) évaluait le marché américain des protéines morphogénétiques pour l'ostéoporose à 500 millions de dollars à l'horizon 1998 et, pour les procédures orthopédiques, à 250 millions de dollars en 1995. Des estimations dont il faut sans doute revoir l'échéance puisque, si l'on croit Genetic Institute, société la plus avancée en terme de développement, les premières formes recombinantes pourraient arriver sur les marchés américain et européen aux alentours de 1997 et en 1998 au Japon.

3-2. LES SUBSTITUTS OSSEUX

Une des faiblesses de la plupart des matériaux utilisés actuellement est leur incapacité à induire la formation de tissu osseux. Le développement des protéines morphogénétiques osseuses pourraient aboutir à des matériaux possédant cette propriétés ostéo-inductrice

Les recherches dans ce domaine sont importantes et le marché économique est très intéressant. *Toutefois, l'os n'est rien sans ce qu'il y a autour, les ligaments, les fibres nerveuses et les récepteurs qui lui insufflent le mouvement et assurent une parfaite mécanique.*

CONCLUSION

Cette étude avait pour but initial de caractériser le tissu osseux par la technique de réflexion diffuse, en spectrométrie d'absorption infrarouge. Notre volonté, dès le départ, de ne pas altérer l'échantillon mais d'observer directement le tissu osseux, sans préparation ni homogénéisation, nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois par une méthode physico-chimique sur un matériau biologique, des composés organo-métalliques vraisemblablement localisés en surface puisque notre méthode d'observation la privilégie.

Les déminéralisations, à l'aide de réactifs chimiques, ont été suivies par l'acquisition d'un spectre infrarouge, *sur le même échantillon* à des temps différents. Les disparitions de certaines bandes d'absorption dans la région des composés organiques (C=O) justifie l'hypothèse de composés organo-métalliques. Une dernière confirmation de cette présence concerne le domaine de la pathologie On observe sur les spectres infrarouge des personnes présentant des pertes osseuses importantes des anomalies dans le domaine généralement attribué aux phosphates de calcium mais aussi dans le domaine des liaisons C=O. Leur spectre infrarouge dans cette région est voisin de celui d'un os ayant subi une déminéralisation à l'acide trichloracétique. De plus, l'examen de ces spectres est généralement très bien relié aux examens histomorphométriques.

Dans la région des phosphates nous avons aussi remarqué la présence de fortes absorptions tendant à disparaitre avec l'âge.

Les traitements mathématiques, déconvolutions et désommations, ont permis de mettre en évidence certaines absorptions dans le domaine des phosphates (1200-1000 cm^{-1}) qui ne sont pas répertoriées en tant que phosphate de calcium. Il est intéressant de noter que ce domaine fait aussi partie des zones d'absorption des sulfates qui sont majoritairement présents dans certaines substances non collagéniques de l'os. Une étude approfondie dans ce domaine serait nécessaire.

Les différences caractéristiques des spectres infrarouge de l'os trabéculaire et de l'os cortical du rat nous permettent d'affirmer que ces deux types d'os ne présentent pas *seulement* des rapports matière organique/matière minérale différents. Les deux couplages ATG-FTIR et ATG-SM ont mis en évidence la présence ou l'absence de certains gaz soit chez l'os trabéculaire, soit chez l'os cortical et ainsi ont amené une preuve supplémentaire de cette diversité de constitution.

L'étude concernant plus précisément l'expérimentation animale a montré que les rats ayant participé au vol spatial présentaient, à l'arrivée, des pertubations, mises en évidence par les spectres infrarouge dans la région des phosphates. Les spectres infrarouges des rats du même groupe mais ayant « récupéré » en vivarium étaient dans la normale, excepté pour la bande d'absorption dans le domaine des carbonates (ou d'hydrogénophosphate?).

Cette technique semble particulièrement bien adaptée à l'étude du tissu osseux et un projet de réseau européen est en cours dans lesquels le centre SPIN de l'Ecole des Mines de St-Etienne interviendrait au niveau analyse d'absorption infrarouge dans la caractérisation du tissu osseux. Le Laboratoire Biologique du Tissu Osseux ainsi que l'Institut Medico-Legal feraient partie de ce réseau ainsi que d'autres laboratoires étrangers (le projet est actuellement mis en place par le MEDES à TOULOUSE).

Il est difficile de conclure une étude aussi passionnante. Le sujet est encore bien enigmatique et les dernières conclusions seront des points d'interrogation :

Pourquoi nos os sont-ils différents suivant leur localisation : le crâne, la crête iliaque, les côtes?

Pourquoi l'acquisition d'un spectre infrarouge est-elle différente (quelquefois ou toujours?) lorsque l'analyse est suffisamment rapprochée du prélèvement? Quel est la durée nécessaire pour avoir un spectre infrarouge « habituel »? Cette durée est-elle la même pour tous les individus?

Les spectres infrarouges observés dans cette étude reflètent-ils la caractérisation du *vrai os* in vivo?

On sait que la mort en général, et d'un organe en particulier, n'est pas un phénomène instantané mais que des séries de *réactions chimiques se terminent et commencent* avec elle.

annexes

ANNEXE 1

LA SPECTROMETRIE D'ABSORPTION INFRAROUGE

Il existe de nombreux ouvrages *théoriques,* spécialisés en spectroscopie. Cette annexe a simplement pour but d'énoncer quelques généralités sur la technique de spectroscopie infrarouge (vocabulaire, principales lois ...)

GENERALITES *(158)*

Le domaine infrarouge se situe entre 1 et 200 µm, soit en nombres d'ondes entre 10000 et 50 cm^{-1}. Le domaine situé entre 4000 et 200 cm^{-1} correspond au domaine des états d'énergie vibrationnels et rotationnels des molécules, états qui dépendent des constantes moléculaires telles que : la symétrie de la molécule, les constances de force interatomiques, le moment d'inertie autour de certains axes...

L'énergie cinétique d'une molécule libre peut varier d'une façon continue, l'énergie associée aux mouvements périodiques de la molécule dans son ensemble (rotations) ou de ses atomes les uns par rapport aux autres (vibrations) et l'énergie interne, ne peuvent prendre que des valeurs discrètes (niveaux d'énergie quantifiés) qui caractérisent des états stationnaires. Placé dans un champ électromagnétique de fréquence ν , la molécule, initialement à l'état quantique E, peut passer à l'état excité E', si la condition de Bohr (condition de résonance) est satisfaite, c'est à dire si :

$\Delta E = E' - E = h\nu$ où $h = 6{,}623 \times 10^{-27}$ erg-seconde (constante de Planck)

Si E' est un état quantique de plus haute énergie que E, la molécule *absorbe* la radiation de fréquence ν lorsqu'elle est excitée de E à E' (elle *émet* la radiation de même fréquence si elle passe de l'état excité E' à l'état E). *Si le champ électromagnétique est balayé en fréquence, il y aura absorption d'énergie pour chaque fréqence correspondant à une transition d'états électroniques, vibrationnels ou rotationnels.*

En première approximation, on admet que le mouvement des électrons de la molécule est indépendant de ceux des noyaux et inversement que les noyaux se déplacent dans un champ électronique moyen constant. On admet aussi que les mouvements de vibration ne dépendent pas des mouvements de rotation : hypothèse de BORN-OPPENHEIMER. Il faut souligner que les énergies de rotation, vibration et les énergies électroniques ne sont pas du même ordre de grandeur et qu'elles intéressent respectivement les domaines micro-ondes, IR et UV-VIS du spectre électromagnétique.

La molécule constituée de N noyaux possède 3N degrés de liberté (types de mouvement) : 3 correspondent à une translation de l'ensemble de la molécule et 3 autres (2 dans le cas d'une molécule linéaire) à une rotation de l'ensemble de la molécule. Il reste donc 3N-6 (3N-5 si la molécule est linéaire) mouvements vibrationnels *appelés modes normaux de vibration* auxquels sont associées 3N-6 fréqences de vibration *appelées fréquences fondamentatales ou normales*. Au point de vue vibrationnel la molécule peut être considérée comme la superposition de 3N-6 oscillateurs.

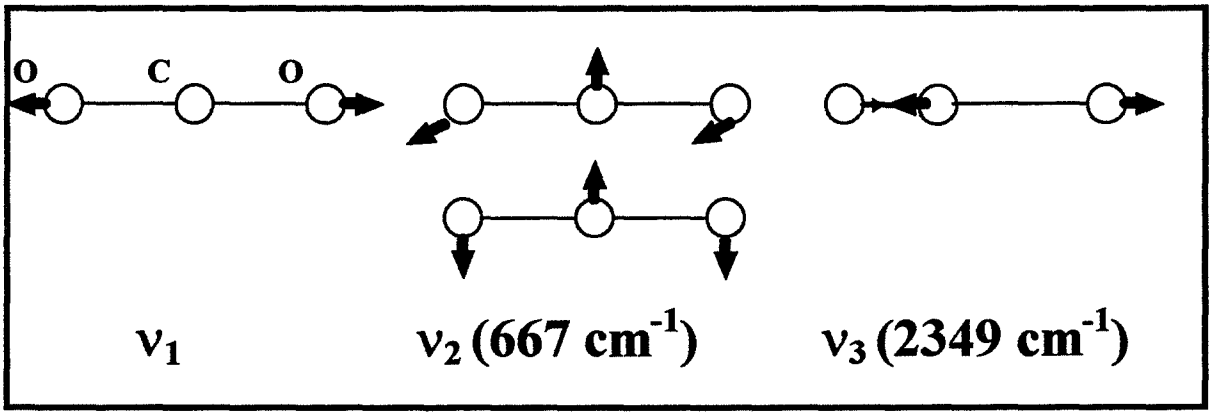
Si la molécule est soumise à une radiation infrarouge dont la fréquence est égale à celle de l'un de ses oscillateurs, celui-ci va entrer en résonance en absorbant une partie de l'énergie du rayonnement. L'intensité de l'absorption (ou de l'émission) est déterminée par la probabilité de transition entre le niveau fondamental et le niveau excité. Les règles qui spécifient si les transitions sont possibles ou non *s'appellent règles de sélection.* On démontre que dans le cas de l'absorption ou de l'émission, seules les transitions associées à des modes de vibration qui s'accompagnent d'une variation du moment dipolaire de la molécule sont permises. Ces modes sont *appelés modes actifs en IR.* On observe que les bandes d'absorption des vibrations fondamentales actives sont les plus intenses et que souvent les bandes les moins intenses correspondent à une combinaison de deux vibrations identiques (harmoniques) ou différentes (combinaisons).

ANNEXE 1

LA SPECTROMETRIE D'ABSORPTION INFRAROUGE

EXEMPLE N° 1 : LE DIOXYDE DE CARBONE

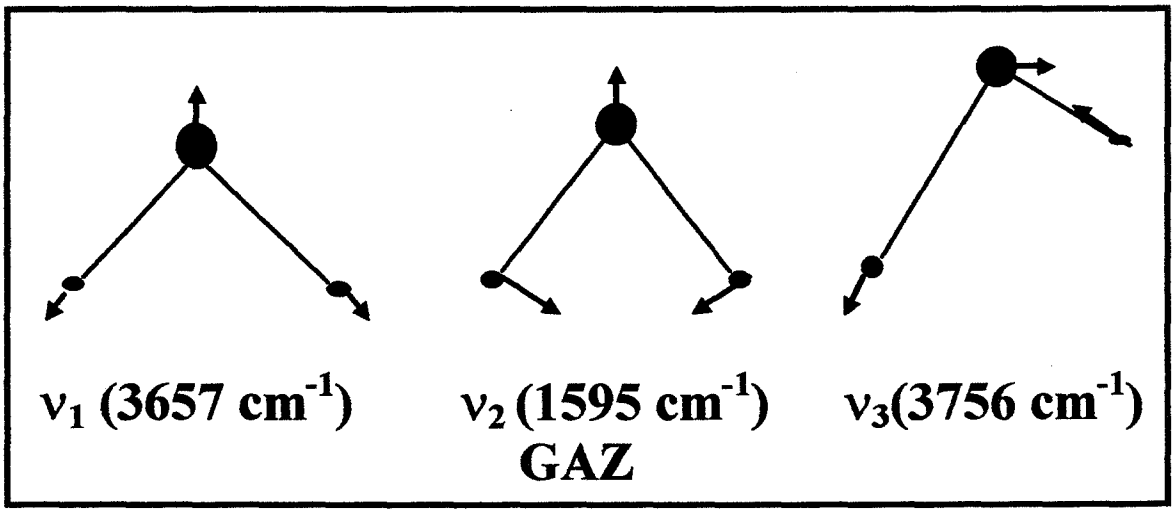
Il s'agit d'une molécule triatomique linéaire, elle possède donc 3N-5 = 4 modes de vibration.



La vibration ν_1 ne s'accompagne pas de variation de moment dipôlaire : elle est inactive en IR. Les vibrations ν_{2a} et ν_{2b} qui sont équivalentes (on les appelle doublement dégénérées) et ν_3 s'accompagnent d'une variation du moment dipolaire. Elles sont actives en IR. Le spectre présente deux absorptions à 667 cm-1 (ν_{2a} et ν_{2b}) et à 2349 cm-1 (ν_3).

EXEMPLE N°2 : L'EAU

Il s'agit d'une molécule triatomique non linéaire, elle possède donc 3N-6 = 3 modes de vibration.

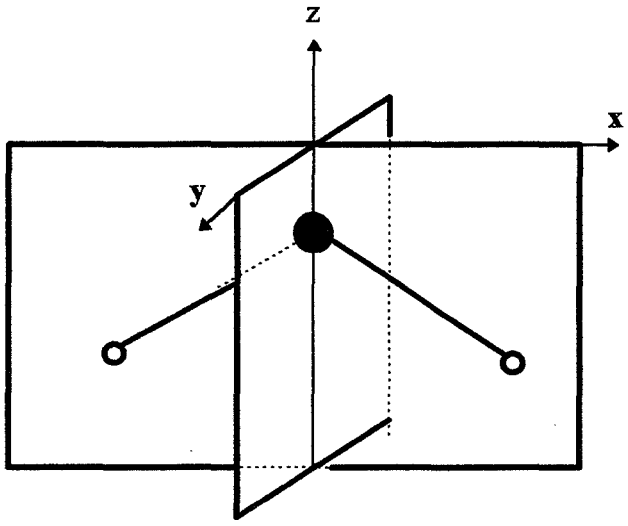


ANNEXE 1

LA SPECTROMETRIE D'ABSORPTION INFRAROUGE

SYMETRIE MOLECULAIRE

La molécule dans sa configuration à l'équilibre peut être considérée comme une construction géométrique définie par des distances interatomiques et des angles valenciels. La présence, dans une telle construction, de noyaux identiques (supposés indiscernables) donne à l'ensemble des propriétés de symétrie. Toutes les opérations de symétrie associées à une molécule définissent le groupe de symétrie auquel elle appartient. Toutes les molécules existantes peuvent être classées en un nombre limité de groupes de symétrie qui obéissent aux règles de la théorie des groupes. Par exemple, la molécule d'eau H_2O, appartient au groupe de symétrie C_{2v} dont les éléments de symétrie sont un axe de rotation z d'ordre 2 et deux plans de réflexion xz et yz. La connaissance du groupe de symétrie auquel appartient la molécule permet de déterminer théoriquement et sans autres données, la classe de symétrie des 3N-6 modes normaux par les coordonnées de symétrie et de factoriser l'équation séculaire.



CALCUL DES FREQUENCES DE VIBRATION

Le calcul des vibrations moléculaires peut être considéré comme un problème de mécanique des petits mouvements. Pour la résoudre, il est nécessaire de déterminer la fonction cinétique et la fonction potentielle des vibrations en fonction des 3N coordonnées de déplacement des N noyaux de la molécule. En admettant l'approximation des mouvements harmoniques, les mouvements possibles et leurs fréquences de vibration sont obtenues en résolvant 3N équations de LAGRANGE qui doivent être compatibles. On obtient finalement en éliminant les mouvements de translation et de rotation de l'ensemble de la molécule une équation séculaire de degré (3N- 6) en λ où $\sqrt{\lambda} = 2\pi\nu$, la molécule possédant 3N-6 fréquences de vibrations qui peuvent ne pas être toutes différentes (vibrations doublement ou triplement dégénérées).

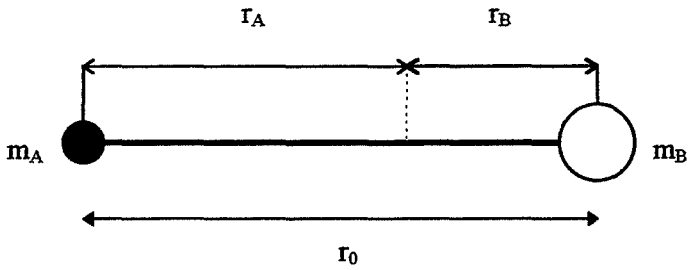
Le choix des coordonnées internes (variation des distances interatomiques et des angles valenciels) comme coordonnées de déplacement et les propriétés des groupes de symétrie permettent de résoudre plus facilement l'équation séculaire (factorisation). *Ces calculs sont toutefois complexes et on se bornera souvent aux fréquences caractéristiques d'un groupe pour exploiter un spectre.* Il suffit dans ce cas de savoir calculer la fréquence de vibration d'une molécule diatomique.

ANNEXE 1

LA SPECTROMETRIE D'ABSORPTION INFRAROUGE

L'OSCILLATEUR HARMONIQUE

La molécule diatomique AB, nécessairement linéaire, ne possède qu'un mode de vibration (3N-5 = 1) qui est l'allongement périodique de la liaison AB. Si on admet que la force d'interaction entre les deux atomes est proportionnelle à l'allongemement de la liaison, cette molécule constitue un oscillateur harmonique.



m_A : masse de A
m_B : masse de B
r_0 : distance A-B à l'équilibre

Si $x = r - r_0$ est la varation de la distance interatomique, la force de rappel s'écrit :

$f = -kx$ (loi de Hooke)

et cette force est aussi égale au produit de la masse par l'accélération (2e loi de Newton).

$$m_A \frac{d^2 r_A}{dt^2} = -kx \quad \text{et} \quad m_B \frac{d^2 r_B}{dt^2} = -kx$$

En tenant compte des relations qui définissent la position du centre de gravité, on obtient une seule équation

$$\frac{m_A m_B}{m_A + m_B} \frac{d^2 x}{dt^2} = -kx$$

qui montre que le système est l'analogue d'une masse unique : $\mu = m_A m_B / (m_A + m_B)$: *masse réduite*

$$\mu \frac{d^2 x}{dt^2} = -kx \quad \textit{a pour solution :}$$

$$x = x_0 \sin(2\pi \nu t + \phi)$$

où

$$\boxed{\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}}$$

$\nu = C \bar{\nu}$
C = vitesse de la lumière
$\bar{\nu}$ = nombres d'ondes

Cette relation est utilisée d'une part pour calculer la fréquence de vibration d'élongation d'une liaison dans une molécule complexe (en prenant comme hypothèse que les vibrations d'un groupe d'atomes sont relativement indépendantes de celles du reste de la molécule et d'autre part pour attribuer certaines fréquences en effectuant une substitution isotopique.

ANNEXE 1

LA SPECTROMETRIE D'ABSORPTION INFRAROUGE

LES FREQUENCES DES GROUPES

De très nombreuses tables établissent les corrélations entre les fréquences d'absorption et les groupements fonctionnels organiques ou minéraux. Notons simplement l'influence de nombreux facteurs : masse, constante de force, reste de la molécule. Il ne faut pas oublier l'état physique de la molécule (solide, liquide, gaz) ainsi que l'influence des solvants (modifications des associations moléculaires).

LES RELATIONS ENTRE L'INTENSITE ET LA CONCENTRATION

Un échantillon d'épaisseur totale l, contenant N molécules, recevant à l'entrée une intensité I_0 restitue à la sortie une intensité I telle que :

$$Ln\frac{I_0}{I} = B_{nm} N h \bar{\nu}_{nm} l$$

où B_{nm} est la propabilité de transition, $\bar{\nu}_{nm}$ la fréquence associée à cette transition et h la constante de Planck.

Pour une transition donnée B_{nm} h $\bar{\nu}_{nm}$ est constante, on obtient alors la loi de Beer-Lambert (cas des solutions, des liquides et des gaz). On remarque la proportionnalité de N avec la pression :

$$Log = \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda \, l \, C$$

ε_λ s'appelle le coefficient d'extinction molaire si la concentration est exprimée en $mol.l^{-1}$ et la longueur de la cellule en centimètre.

INFLUENCE DE LA CONSTANTE DE FORCE

Quelques exemples illustrent ce paramètre

groupements	constantes de force mdyne $Å^{-1}$	nombres d'ondes cm^{-1}	
C≡C	14.8	1980	acétylène
C = C	10.8	1623	éthylène
C - C	4.6	993	ethane

ANNEXE 1

LA SPECTROMETRIE D'ABSORPTION INFRAROUGE

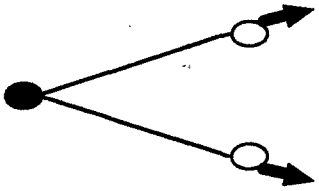
NOMENCLATURE DES TYPES DE VIBRATIONS

DEFORMATION D'UNE LIAISON

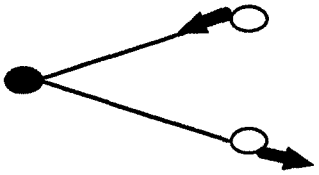
Elongation d'une liaison
vibration de valence - d'élongation - (stretching) ν

Elongation de deux liaisons de même type

vibration de valence - d'élongation - symétrique ν_s

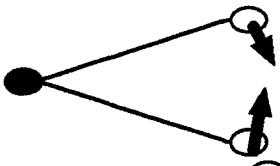


vibration de valence - d'élongation - antisymétrique ν_{as}

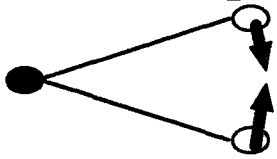


DEFORMATION D'UN ANGLE

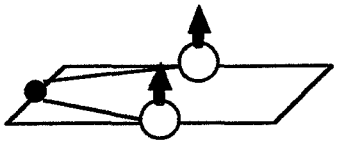
vibration de déformation (bending) δ
est utilisée lorsque la structure du groupe est simple
sinon on utilise les nomenclatures suivantes :



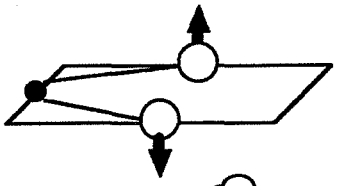
vibration de cisaillement *dans le plan* (scissors) δ



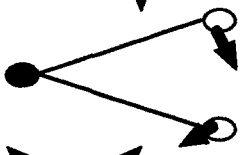
vibration de balancement *hors du plan* (wagging) γ



vibration de torsion *hors du plan* (twisting) ρ

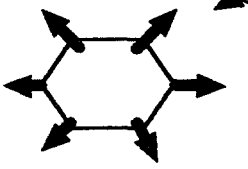


vibration de rotation *dans le plan* (rocking) β



DEFORMATION D'UN CYCLE

respiration du cycle (breathing)

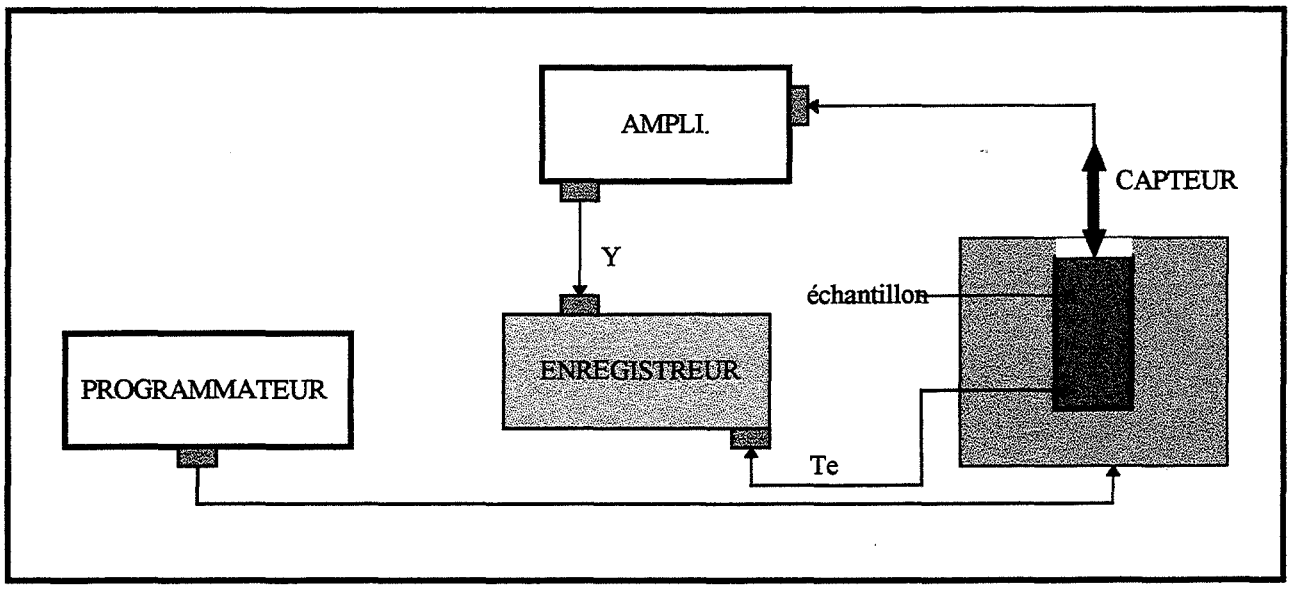


ANNEXE 2

L'ANALYSE THERMOGRAVIMETRIQUE

GENERALITES

Le principe de toute analyse thermique est schématisé comme suit :



⇒ le four permet de chauffer l'échantillon
⇒ le capteur assure le suivi de la propriété mesurée
⇒ les périphériques permettent de piloter le four, d'amplifier le signal et de faire l'acquisition de données sur enregistreur ou mise en mémoire sur support informatique.

La thermogravimétrie est une technique par laquelle on suit la masse d'une substance soumise à un programme thermique. 3 types d'analyses sont pratiquées :
⇒ *analyse isotherme* : variation de la masse en fonction du temps à une température donnée
⇒ *anslyse dynamique* : variation de masse en fonction de la température (en général programmation linéaire de la température).
⇒ *analyse quasistatique* : pilotage particulier de la température pour avoir une vitesse de décomposition constante (plus rarement utilisée).

Les phénomènes étudiés en analyse thermogravimétrique :
⇒ *évaporation, sublimation, décomposition*
⇒ *changement structural ou chimique avec perte, stoechiométrieque ou non, d'un ou plusieurs constituants*
⇒ *corrosion avec formation de composés volatils*

On peut aussi étudier des *gains de masse* par fixation avec ou sans réaction chimique :
⇒ *oxydation, fluoration, chloration, hydratation, carbonatation*
⇒ *adsoption de gaz, d'eau*

ANNEXE 3

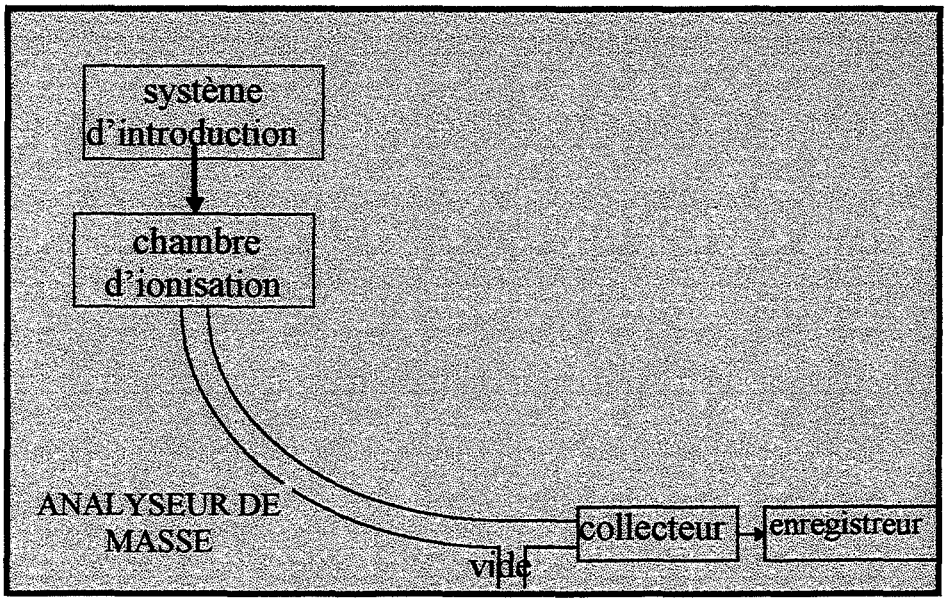
LA SPECTROMETRIE DE MASSE

GENERALITES

La spectrométrie de masse est une technique d'identification des molécules par l'examen de leurs fragments. Ceux-ci sont formés, sous vide, par ruptures successives des liaisons chimiques provoquées par l'impact de particules (électrons, ions, atomes...) Ces fragments sont caractérisés par un rapport m/z (masse/charge). La charge est généralement égale, en valeur absolue, à l'unité (celle de l'électron). Par simplification on désigne les ions par leur masse exprimée en u.m.a. (unité de masse atomique). L'identification des fragments et leur assemblage, à la façon d'un puzzle, permettent de reconstituer la structure. Les spectres se présentent d'une série de pics, l'abscisse indique la masse et l'ordonnée exprime l'abondance de chaque ion. Le pic de masse la plus élevée est le pic moléculaire ou pic parent. Sa valeur est une donnée importante. Le pic le plus intense du spectre est appelé pic de base. Sa hauteur est fixée arbitrairement à 100. L'intensité des autres ions s'exprime en pourcentage du pic de base.

PRINCIPE

La spectrométrie de masse fonctionne sous un vide poussé pouvant atteindre 10^{-7} mm Hg. Les échantillons à analyser se présentent sous différents états : gazeux, liquides, solides. Ils doivent parvenir dans la chambre d'ionisation par des systèmes d'introduction. Les ions produits en sont extraits et séparés dans l'analyseur de masses. En sortie d'analyseur, un dispositif collecteur recueille les ions triés. Un amplificateur intensifie les signaux résultants qui sont visualisés sur un enregistreur.

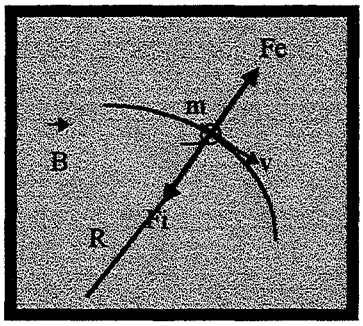


L'analyseur a pour rôle de trier les ions selon leur masse. Les analyseurs les plus répandus sont de type secteur magnétique et filtre quadripolaire. Le filtre quadripolaire se compose de quatre barres métalliques disposées symétriquement. Les barres opposées sont connectées électriquement. Une tension est appliquée entre chaque couple. Cette tension V possède deux composantess continue et alternative U et $V_0 \cos \omega t$ et U/V_0 = constante.

ANNEXE 3

LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Soient z la charge de l'ion de masse m, v sa vitesse, V la tensioin d'accélération, R le rayon de secteur magnétique. L'énergie cinétique acquise par l'ion est ½ $mv^2 = zV$. L'ion sortira de l'analyseur magnétique si la force centripète Fi exercée par le champ magnétique B équilibre la force centrifuge Fe.
$v . B . z = m v^2 / R$. En explicitant v dans ces deux relations on tire $m/z = R^2B^2 / 2V$. On constate que la variation de champ magnétique permet aux ions de différenes masses de franchir l'analyseur.



Le paramètre le plus important de l'analyseur de masses est son pouvoir séparateur ou sa résolution. Par commodité, les spectres sont représentés sous forme de barres-graphes . La forme réelle des pics est gaussienne. La résolution s'exprime par le rapport : $R = M / \Delta m$. M est la masse associée au pic et Δm sa largeur à 5% de hauteur de leur intensité. La dispersion des ions en énergie est le facteur principal qui limite la résolution du spectromètre de masse. Cette dispersion provient essentiellement du mouvemenmt brownien des molécules dans la source d'ionisation. Le pouvoir séparateur d'un analyseur magnétique ne dépasse pas 10 000. Si on équipe un spectromètre à simple focalisation (en direction) d'un filtre d'énergie, on réalise un spectromètre à double focalisation (direction et vitesse) dont la résolution peut dépasser 100 000. La focalisation en vitesse est réalisée par le champ électrique radial d'un condensateur cylindrique. Cet analyseur électrique (ou secteur électrique) peut être placé avant ou après l'analyseur magnétique car il ne discrimine pas les masses.
Un ion de masse m, de charge z, qui traverse le condensateur cylindrique de rayon R' est soumis à deux forces opposées, centrifuge Fe et centripète Fi qui s'annulent : mv2 / R' = Ez. L'énergie cinétique de l'ion accéléré sous la tension V est ½ $mv^2 = z V$. En éliminant v dans ces relations on tire $R' = 2V / E$. On constate que la trajectoire est indépendante de la masse et de la charge.

LES DOMAINES D'APPLICATIONS

⇒ **Elucidation des structures** : la synthèse organique met largement à contribution l'analyse structurale. Dan ce domaine la SM est étroitement associée à la RMN et l'IR qui lui sont complémentaires. La biochimie et la chimie des substances naturelles font aussi appel à ces techniques.

⇒ **Analyse des mélanges** : On utilise la spectrométrie de masse *en association* avec les techniques séparatives : le couplage chromatographie en phase gazeuse / masse (CPG / SM) opérationnel depuis plus de 20 ans permet l'identification de constituants à des teneurs voisines de la ppm (partie par million) ; le couplage chromatographie en phase liquide haute performance / masse (CLHP / SM) est plus délicat à réaliser à cause des difficultés d'élimination des solvants.

⇒ **Recherches sélectives de trace** : *la fragmentométrie* est une méthode de recherche sélective de traces dans un mélange. Le principe consiste à se « caler » sur un ou plusieurs fragments spécifiques d'un composé afin de détecter sa présence et le doser. La limite de détection dépasse la ppb. Cette technique est utilisée pour la recherche de dioxines. La *technique masse / masse* (SM / SM) associe deux spectromètres. Le premier sélectionne, dans un spectre complexe, l'ion représentatif d'un composé. Le second spectromètre analyse les fragments typés de cet ion après collision avec un gaz. Le spectre obtenu constitue une preuve indiscutable de la présence d'un composé.

⇒ **analyse isotopiques**

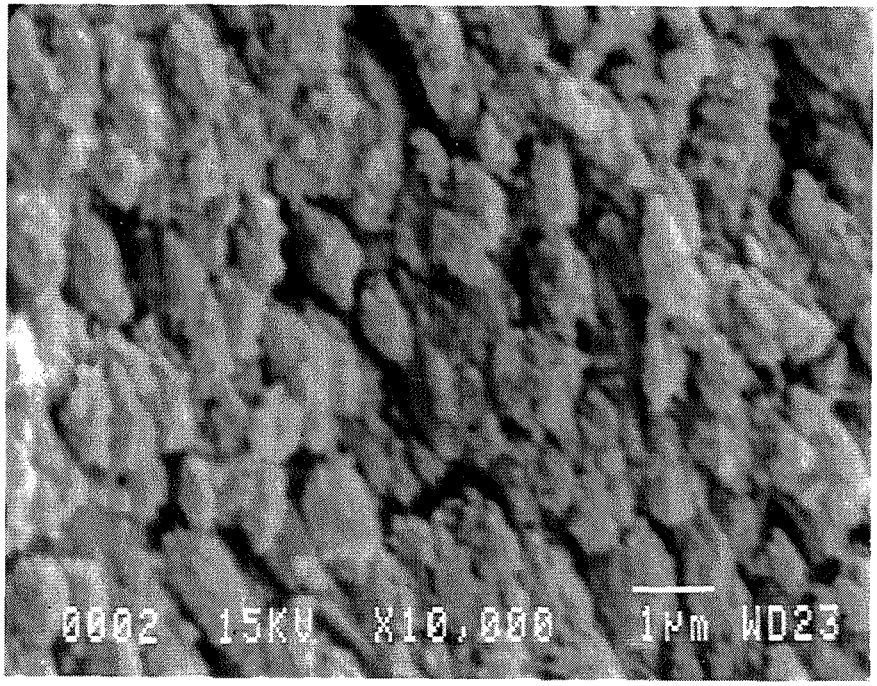
⇒ **analyse de gaz** : la spectrométrie de masse occupe une grande place dans l'analyse des gaz : analyse de l'atmosphère des planètes, des gaz de réacteurs et en médecine, des gaz respiratoires pour études de métabolisme etc...

ANNEXE 4

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

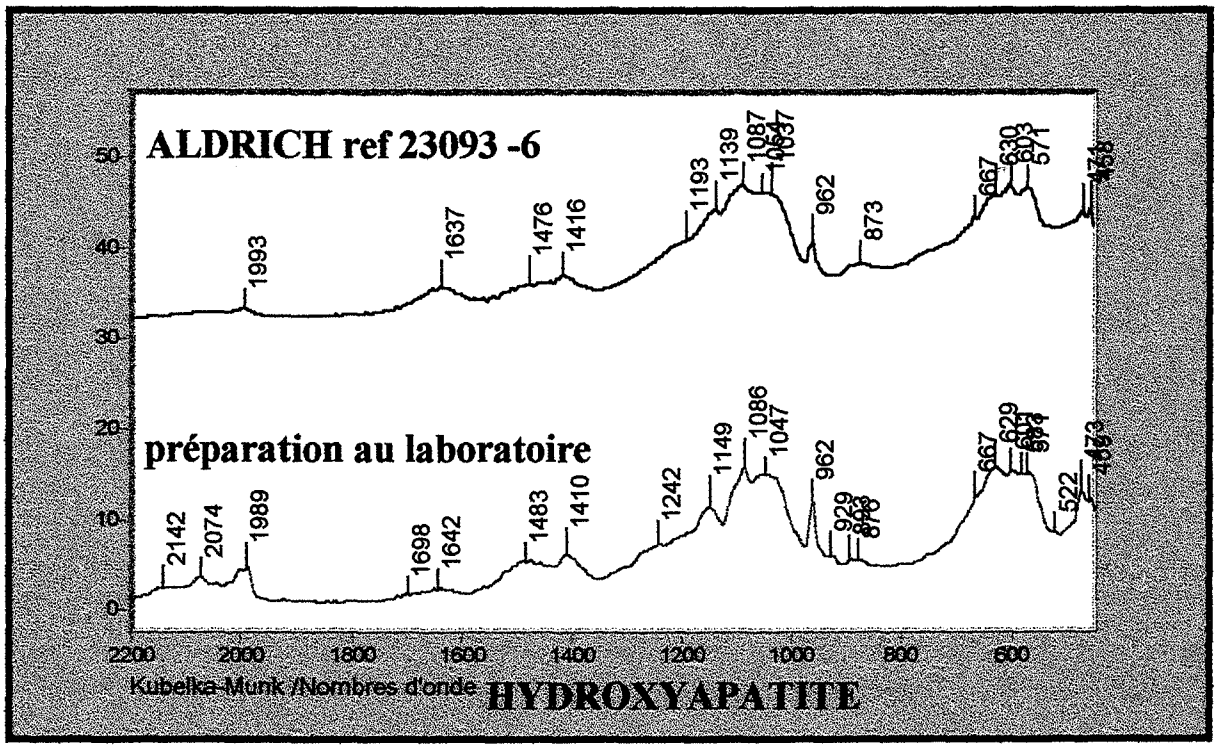
JEOL JSM 840

OS TRABECULAIRE



ANNEXE 5

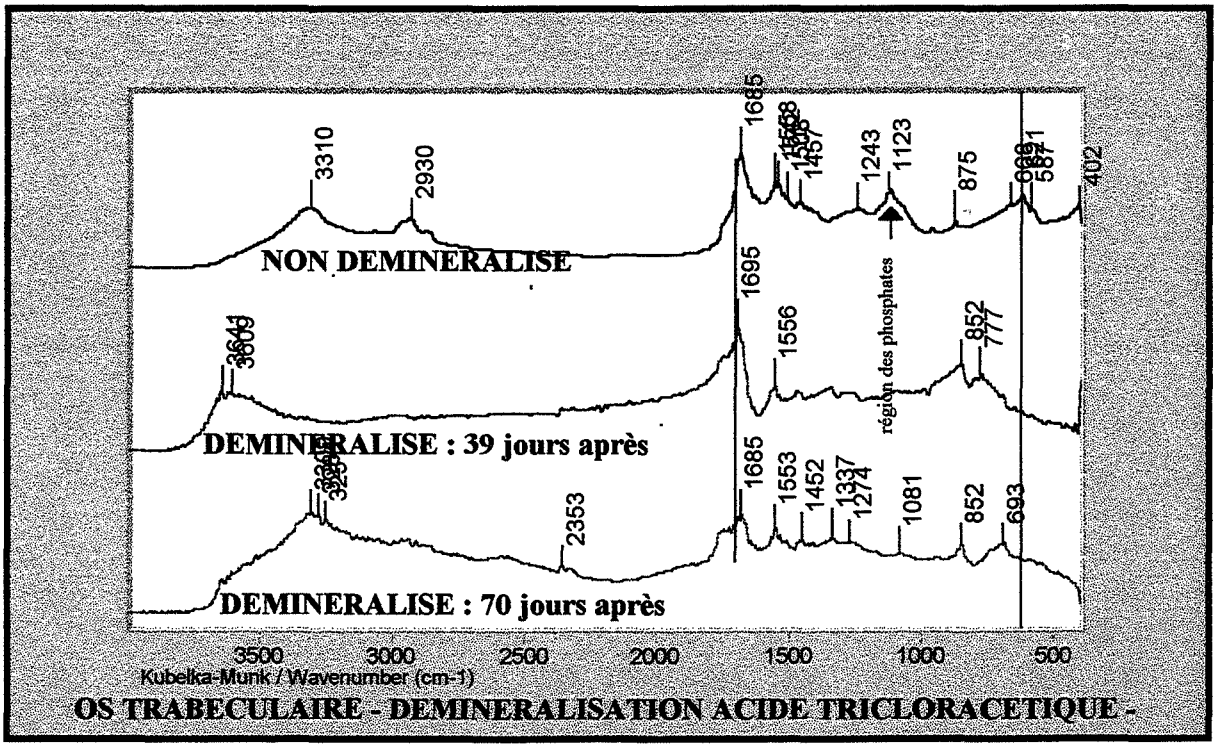
MATERIAUX DE REFERENCE

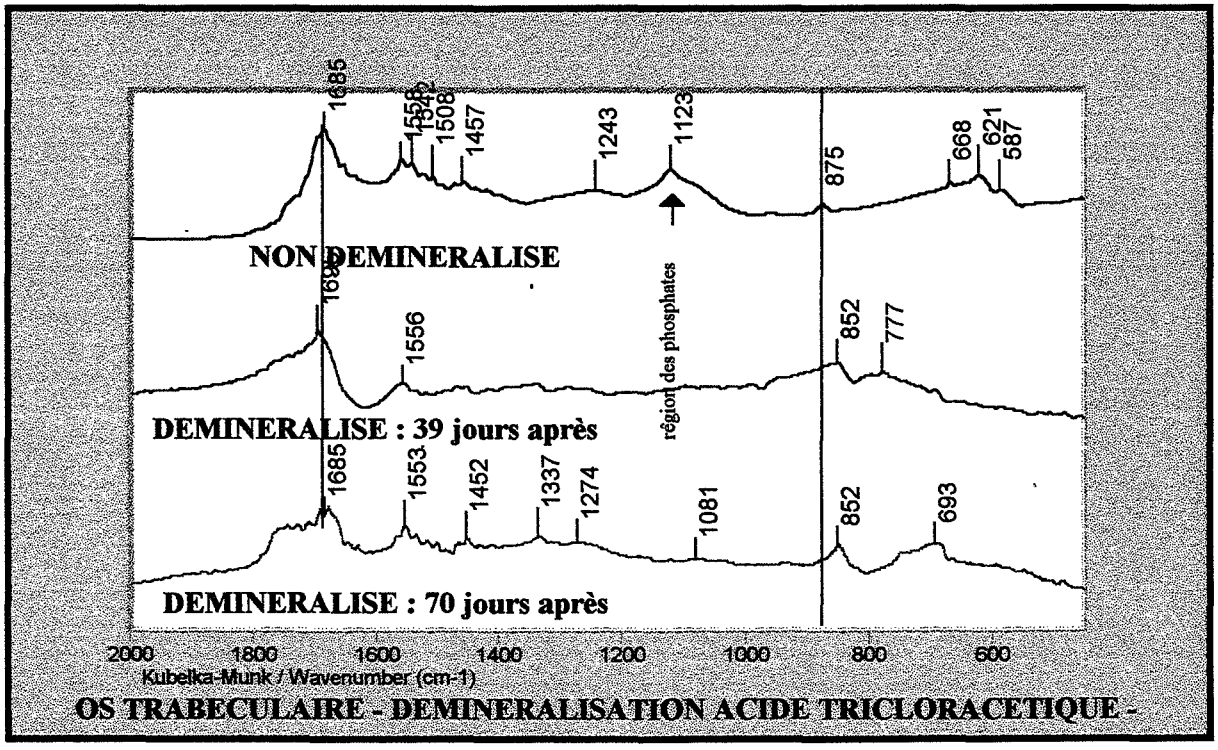


ANNEXE 6

LES DEMINERALISATIONS

A. BOSKEY[1] nous a conseillé ces déminéralisations pour obtenir une référence de collagène afin d'identifier le domaine des bandes amides C = O vers 1650 cm^{-1}. Cette étude n'est pas exposée dans ce mémoire. Les déminéralisations ont été effectuées au Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux du professeur ALEXANDRE à SAINT-ETIENNE par N. LAROCHE.

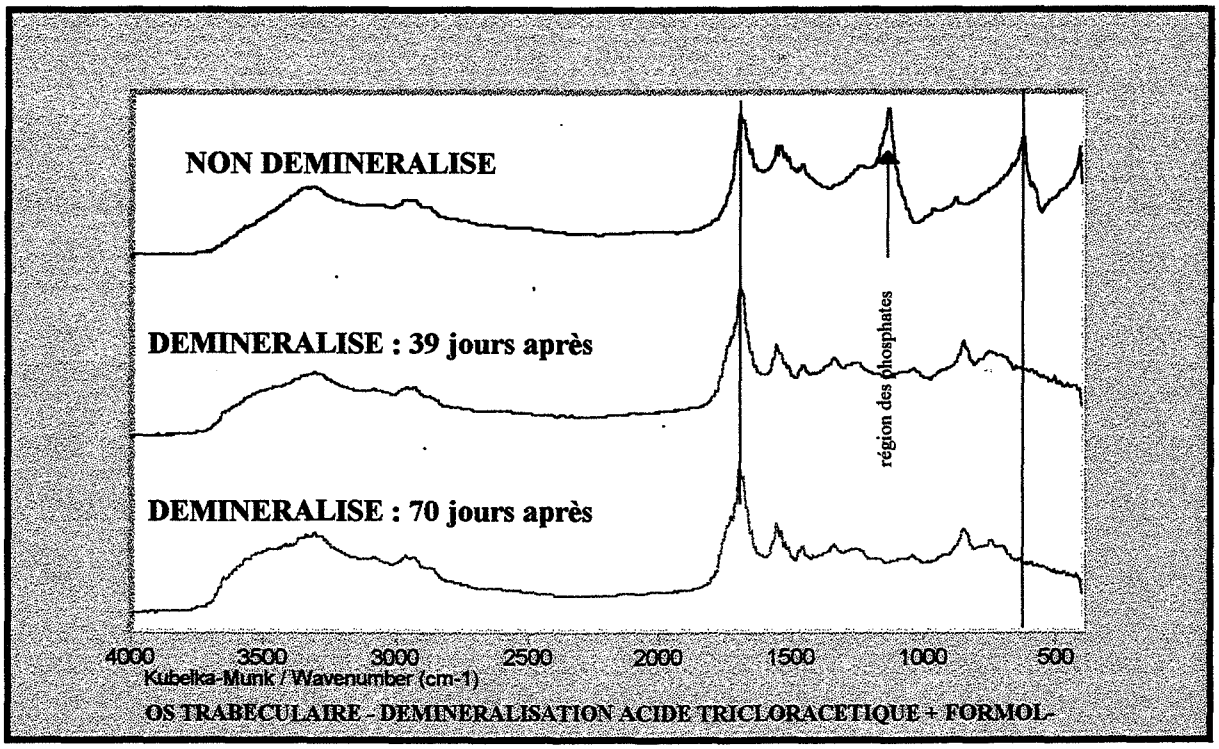




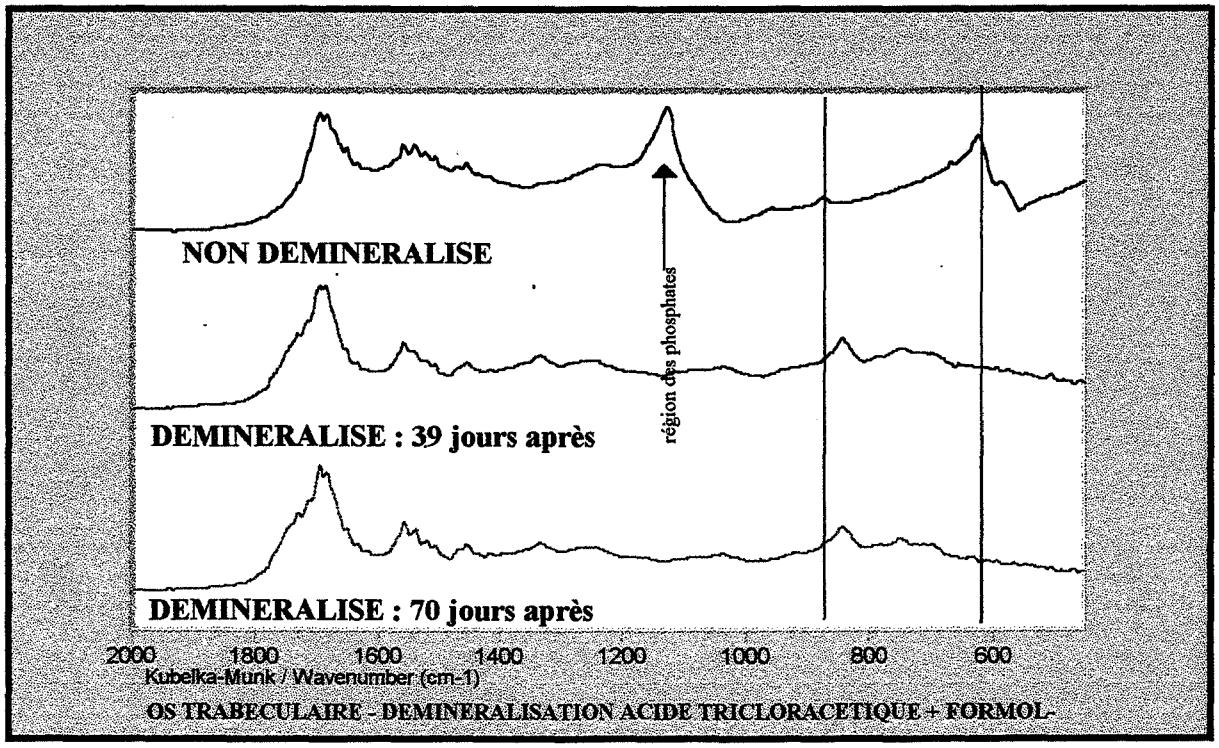
1 : The laboratory for ultrastructural biochemistry. The hospital for Special Surgery, NEW YORK,N Y.

ANNEXE 6

LES DEMINERALISATIONS



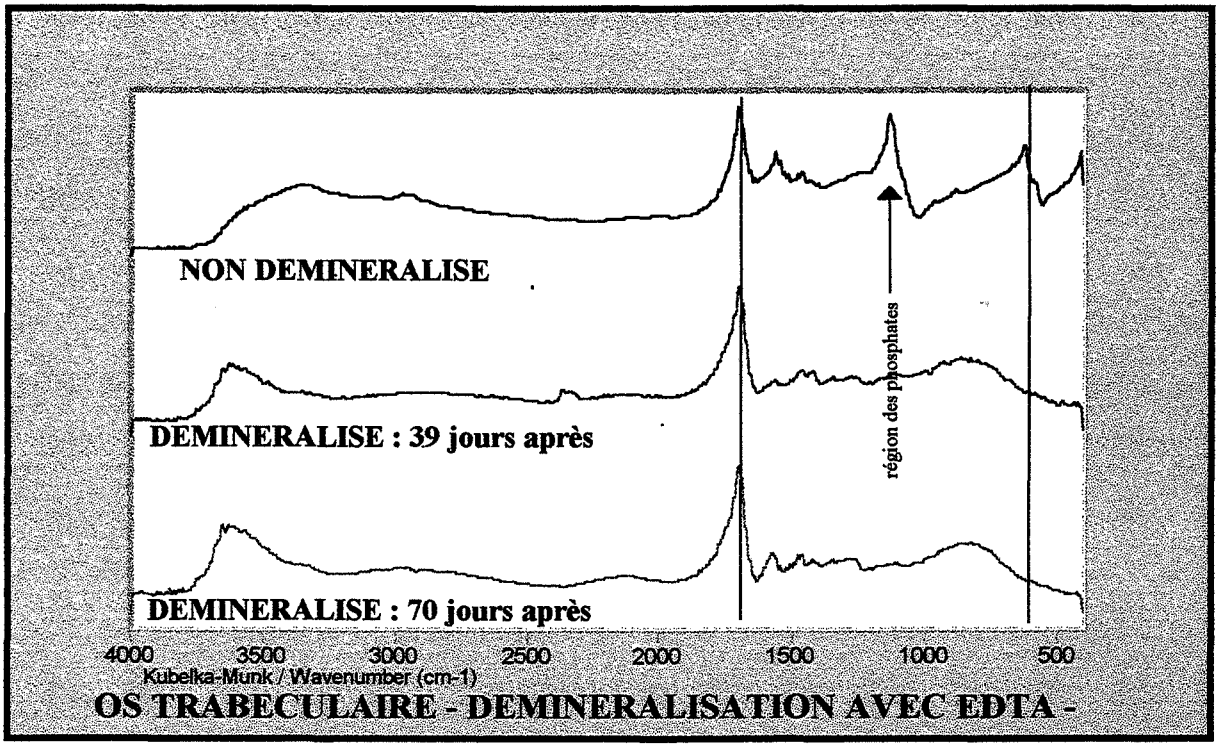
OS TRABECULAIRE - DEMINERALISATION ACIDE TRICLORACETIQUE + FORMOL-



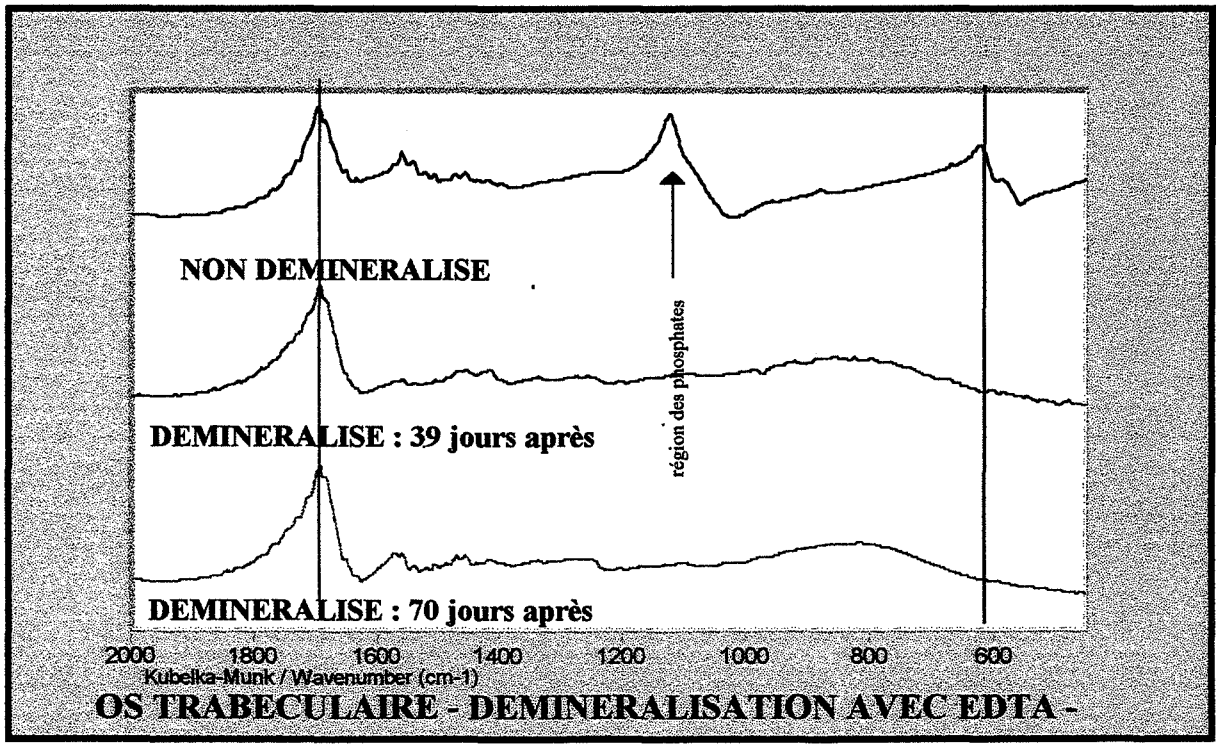
OS TRABECULAIRE - DEMINERALISATION ACIDE TRICLORACETIQUE + FORMOL-

ANNEXE 6

LES DEMINERALISATIONS



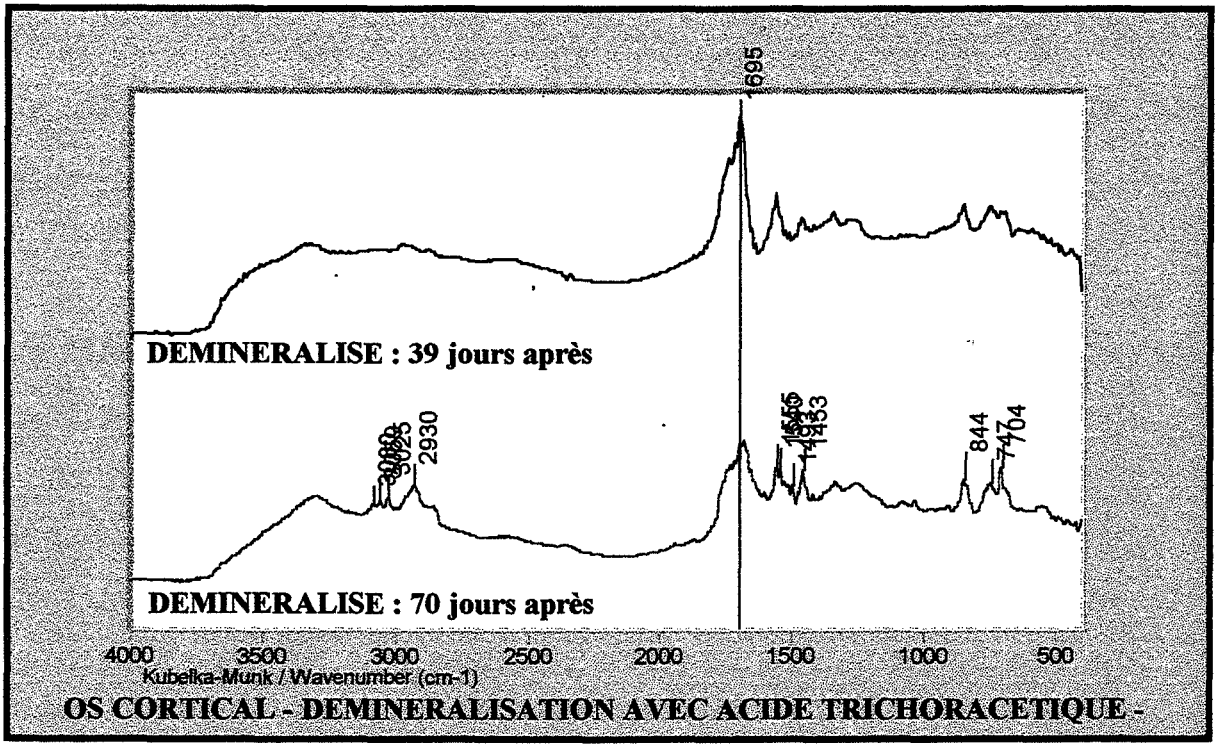
OS TRABECULAIRE - DEMINERALISATION AVEC EDTA -



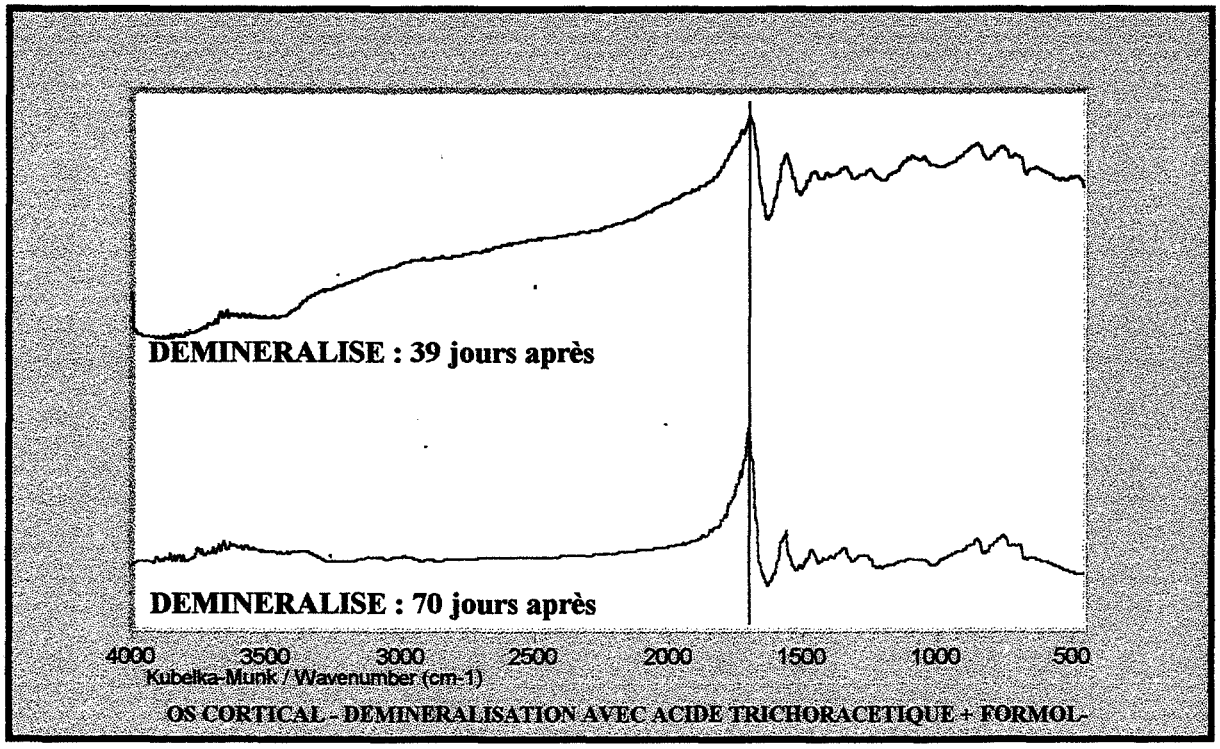
OS TRABECULAIRE - DEMINERALISATION AVEC EDTA -

ANNEXE 6

LES DEMINERALISATIONS



OS CORTICAL - DEMINERALISATION AVEC ACIDE TRICHORACETIQUE -



OS CORTICAL - DEMINERALISATION AVEC ACIDE TRICHORACETIQUE + FORMOL-

ANNEXE 7

EXEMPLE DE CALCULS DES AIRES - REGION 1420-1370 cm-1

1LOC cm-1	1LOC aire	1LOC % aire	2LOC cm-1	2LOC aire	2LOC % aire	3LOC cm-1	3LOC aire	3LOC % aire	4LOC cm-1	4LOC aire	4LOC % aire	5LOC cm-1	5LOC aire	5LOC % aire	Moy. LO cm-1 LO	ecartype cm-1 LO	Moy. LO % aire	ecartype %aire LO
						1423.8	0.36											
1415.6	1.92	6.18	1419.1	2.06	7.70	1419.2	2.01	13.15	1416.0	3.68	10.21	1414.2	1.32	4.58	1416.8	2.2	8.36	3.39
1409.3	16.15	51.94	1411.0	3.14	11.70	1410.5	1.44	9.44	1408.1	10.97	30.48	1405.6	11.90	41.15	1408.9	2.2	28.94	18.43
1401.7	1.47	4.73	1404.1	5.89	22.00	1404.7	1.66	10.86	1401.9	3.58	9.94	1400.6	0.72	2.47	1402.6	1.7	10.00	7.57
1396.8	2.01	6.46	1399.1	2.47	9.23	1399.3	2.13	13.95	1397.4	3.81	10.58	1395.6	2.56	8.86	1397.6	1.6	9.82	2.75
1391.3	4.07	13.08	1394.5	5.02	18.74	1394.6	2.47	16.21	1391.6	5.43	15.09	1389.9	3.48	12.03	1392.4	2.1	15.03	2.64
1384.4	2.91	9.35	1387.8	3.26	12.18	1387.8	2.47	16.17	1385.3	2.21	6.13	1382.6	4.80	16.60	1385.6	2.2	12.09	4.48
1378.7	1.91	6.15	1380.1	3.51	13.11	1380.3	1.78	11.65	1379.3	6.32	17.56	1376.6	0.73	2.51	1379.0	1.5	10.20	5.92
1371.1	0.65	2.10	1374.0	0.99	3.69	1374.1	1.31	8.56				1370.0	3.41	11.80	1372.3	2.1	6.54	4.46
			1368.5	0.45	1.66													
	31.10	100		26.79	100		15.25	100		35.99	100		28.91	100				

6 SCRO cm-1	aire	% aire	7 SC RO cm-1	aire	% aire	8 SC RO cm-1	aire	% aire	9 SC RO cm-1	aire	% aire	10 SC RO cm-1	aire	% aire	SC RO cm-1	ecartype cm-1	Moy. SC RO % aire	ecartype %aire RO
						1422.9	-0.88		1428.5	-0.02		1423.9	0.26					
1415.4	2.61	5.22	1415.5	7.98	11.90	1419.4	0.49	4.65	1418.8	2.87	16.63	1419.0	1.72	9.13	1417.6	2.0	9.51	4.96
1408.7	24.65	49.37	1408.4	20.02	29.86	1410.0	0.67	6.33	1410.0	0.91	5.27	1410.0	11.90	63.04	1409.4	0.8	30.77	25.67
1401.7	2.47	4.95	1401.5	5.90	8.80	1404.6	1.84	17.36	1404.5	2.00	11.60	1404.7	0.90	4.79	1403.4	1.6	9.50	5.23
1396.8	3.45	6.91	1396.5	6.43	9.59	1399.8	1.46	13.84	1399.0	3.07	17.79	1398.8	1.22	6.45	1398.2	1.5	10.92	4.84
1391.2	5.75	11.52	1391.3	10.87	16.22	1395.1	2.24	21.20	1394.4	3.69	21.37	1394.4	0.90	4.76	1393.3	1.9	15.01	7.03
1384.2	4.66	9.33	1384.3	6.28	9.36	1388.4	1.35	12.75	1387.5	2.94	17.07	1387.5	0.74	3.90	1386.4	2.0	10.48	4.86
1378.1	4.39	8.79	1378.5	6.21	9.26	1380.6	2.29	21.66	1379.2	1.10	6.40	1379.0	0.13	0.71	1379.1	0.9	9.36	7.67
1370.8	1.96	3.93	1370.8	3.36	5.01	1374.6	0.23	2.21	1374.4	0.67	3.86	1374.2	0.46	2.44	1373.0	2.0	3.49	1.16
			1366.2	1.21	1.81	1365.5	-0.15											
	49.93	100		67.05	100		10.57	100		17.25	100		17.97	95				

ANNEXE 7

EXEMPLE DE CALCULS DES AIRES - REGION 1420-1370 cm-1

11RMLC cm-1	aire	% aire	12RMLC cm-1	aire	% aire	13VCRMI cm-1	aire	% aire	14VCRMI cm-1	aire	% aire	15VCRMI cm-1	aire	% aire	Moy. VC RMI cm-1	ecartype cm-1	Moyennes % aire	ecartype %aire
1416.6	6.78	*11.21*	**1416.1**	2.36	*6.51*	**1416.3**	3.02	*6.26*	**1416.3**	5.81	*9.63*	**1418.0**	1.23	*8.26*	1416.7	0.8	8.38	2.10
1408.4	19.56	*32.37*	**1407.3**	9.15	*25.27*	**1406.7**	14.32	*29.70*	**1408.2**	15.57	*25.81*	**1408.2**	3.19	*21.45*	1407.8	0.7	26.92	4.22
1402.6	4.61	*7.62*	**1401.7**	4.03	*11.12*	**1402.0**	2.93	*6.08*	**1402.0**	4.79	*7.95*	**1403.3**	1.31	*8.80*	1402.3	0.6	8.31	1.85
1397.4	7.23	*11.96*	**1397.2**	3.33	*9.20*	**1397.1**	4.93	*10.24*	**1397.0**	6.39	*10.60*	**1398.7**	1.35	*9.08*	1397.5	0.7	10.22	1.17
1392.4	9.26	*15.32*	**1392.2**	7.63	*21.07*	**1392.1**	7.09	*14.71*	**1392.1**	9.64	*15.98*	**1394.0**	3.09	*20.82*	1392.5	0.8	17.58	3.10
1385.4	5.21	*8.62*	**1385.3**	3.12	*8.61*	**1385.1**	7.04	*14.61*	**1384.8**	9.17	*15.20*	**1387.0**	1.66	*11.19*	1385.5	0.8	11.65	3.16
1378.5	4.55	*7.53*	**1379.0**	5.44	*15.01*	**1379.0**	1.38	*2.85*	**1378.5**	3.46	*5.74*	**1378.3**	2.55	*17.16*	1378.7	0.3	9.66	6.15
1372.0	3.25	*5.37*	**1371.4**	1.17	*3.22*	**1373.3**	7.50	*15.55*	**1372.1**	5.48	*9.08*	**1373.1**	0.48	*3.24*	1372.4	0.8	7.29	5.20
	60.43	*100*		*36.23*	*100*		*48.21*	*100*		*60.32*	*100*		*14.86*	*100*				

16 FRO cm-1	aire	% aire	17 FRO cm-1	aire	% aire	18 FRO cm-1	aire	% aire	19 FRO cm-1	aire	% aire	20 FRO cm-1	aire	% aire	Moy. FRO cm-1	ecartype cm-1	Moy. FRO % aire	ecartype %aire
			1422.9	0.18	*2.36*				**1422.0**	0.26	*2.80*	**1423.4**	0.22	*1.80*	1422.8	0.7	2.32	0.50
1415.9	5.62	*7.45*	**1417.8**	0.99	*13.03*	**1415.6**	7.00	*7.18*	**1417.6**	0.48	*5.14*	**1418.3**	2.63	*21.82*	1417.0	1.2	10.92	6.76
1407.6	24.92	*33.05*	**1406.9**	2.50	*32.84*	**1406.4**	28.27	*29.00*	**1407.2**	4.55	*48.67*	**1410.0**	0.84	*6.95*	1407.6	1.4	30.10	14.98
1401.6	5.50	*7.30*	**1403.5**	0.41	*5.41*	**1402.2**	3.49	*3.58*	**1403.1**	0.35	*3.71*	**1404.1**	1.46	*12.08*	1402.9	1.0	6.42	3.51
1396.9	7.55	*10.02*	**1398.3**	0.63	*8.27*	**1398.0**	4.54	*4.66*	**1398.0**	0.58	*6.20*	**1398.6**	1.64	*13.62*	1398.0	0.6	8.55	3.48
1391.6	15.29	*20.28*	**1393.7**	1.29	*16.90*	**1392.8**	15.71	*16.11*	**1393.2**	0.99	*10.62*	**1394.2**	2.29	*19.00*	1393.1	1.0	16.58	3.72
1384.9	9.46	*12.55*	**1386.6**	0.84	*11.05*	**1384.6**	3.83	*3.93*	**1386.6**	0.95	*10.12*	**1386.9**	1.49	*12.38*	1385.9	1.1	10.01	3.54
1379.6	6.45	*8.56*	**1379.3**	0.38	*4.94*	**1379.8**	33.12	*33.97*	**1380.8**	0.06	*0.69*	**1377.6**	0.77	*6.41*	1379.4	1.2	10.91	13.21
1371.4	0.60	*0.80*	**1373.3**	0.40	*5.21*	**1371.1**	1.53	*1.57*	**1375.9**	1.13	*12.06*	**1373.5**	0.72	*5.93*	1373.0	1.9	5.11	4.48
	75.39	*100.00*		*7.60*	*100.00*		*97.50*	*100.00*		*9.34*	*100.00*		*12.06*	*100.00*				

ANNEXE 7

EXEMPLE DE CALCULS DES AIRES - REGION 1420-1370 cm-1

21SCRML cm-1	aire	% aire	22SCRML cm-1	aire	% aire	23SCRML cm-1	aire	% aire	24SCRML cm-1	aire	% aire	25SCRML cm-1	aire	% aire	Moy. SCRML cm-1	ecartype cm-1	Moy. SCRML % aire	ecartype %aire
1416.6	1.68	*11.99*	**1418.9**	1.31	*6.35*	**1418.8**	3.54	*14.93*	**1416.8**	2.97	*7.99*	**1417.2**	7.21	*17.33*	1417.7	1.1	11.72	4.60
1411.0	0.61	*4.33*	**1410.4**	2.38	*11.50*	**1410.6**	2.23	*9.42*	**1407.8**	7.16	*19.29*	**1410.4**	4.96	*11.94*	1410.0	1.3	11.30	5.39
1403.9	2.41	*17.17*	**1404.5**	3.60	*17.39*	**1404.3**	5.32	*22.45*	**1402.7**	2.45	*6.59*	**1403.2**	5.55	*13.35*	1403.7	0.8	15.39	5.89
			1399.0	2.88	*13.91*	**1398.6**	4.31	*18.16*	**1397.8**	3.38	*9.12*	**1398.2**	4.79	*11.52*	1398.4	0.5	13.18	3.85
1394.1	5.46	*38.88*	**1394.1**	3.84	*18.57*	**1394.3**	4.03	*16.99*	**1392.9**	6.94	*18.70*	**1393.6**	11.26	*27.09*	1393.8	0.6	24.05	9.19
1385.3	0.95	*6.79*	**1387.7**	2.44	*11.76*	**1387.7**	2.75	*11.60*	**1385.9**	2.68	*7.21*	**1386.2**	5.09	*12.24*	1386.6	1.1	9.92	2.68
1379.8	1.27	*9.07*	**1380.8**	3.11	*15.04*	**1376.0**	1.53	*6.45*	**1380.1**	10.03	*27.02*			*0.00*	1379.2	2.1	11.52	10.21
1372.5	1.65	*11.76*	**1374.9**	1.13	*5.48*			*0.00*	**1372.2**	1.15	*3.09*	**1373.0**	2.72	*6.53*	1373.1	1.2	5.37	4.36
									1367.3	0.36	*0.97*							
	14.04	*100*		*20.70*	*100*		*23.71*	*100*		*37.11*	*100*		*41.58*	*100*				

26FRML cm-1	aire	% aire	27FRML cm-1	aire	% aire	28FRML cm-1	aire	% aire	29FRML cm-1	aire	% aire	30FRML cm-1	aire	% aire	Moy. FRML cm-1	ecartype cm-1	Moy. FRML % aire	ecartype %aire
1415.6	9.18	*8.88*	**1417.7**	0.82	*13.33*	**1415.3**	18.39	*12.78*	**1417.8**	1.34	*13.47*	**1418.6**	0.72	*8.87*	1417.0	1.5	11.46	2.38
1409.1	45.89	*44.38*	**1410.1**	0.58	*9.45*	**1407.6**	33.23	*23.10*	**1407.7**	1.24	*12.40*	**1409.2**	1.49	*18.51*	1408.7	1.1	21.57	13.81
1401.6	4.89	*4.73*	**1403.4**	0.87	*14.14*	**1401.4**	9.27	*6.44*	**1404.1**	0.65	*6.55*	**1403.9**	1.00	*12.34*	1402.9	1.3	8.84	4.13
1396.4	7.45	*7.20*	**1398.6**	0.60	*9.70*	**1396.0**	16.03	*11.14*	**1399.0**	1.46	*14.67*	**1399.1**	1.05	*13.00*	1397.8	1.5	11.14	2.89
1391.6	15.66	*15.15*	**1394.2**	1.59	*25.81*	**1391.1**	23.76	*16.52*	**1394.1**	2.39	*23.90*	**1394.3**	1.50	*18.60*	1393.1	1.6	19.99	4.65
1384.6	8.68	*8.40*	**1386.6**	0.86	*14.02*	**1384.0**	16.40	*11.40*	**1386.8**	1.45	*14.55*	**1387.5**	1.01	*12.57*	1385.9	1.5	12.19	2.45
1378.1	11.65	*11.26*	**1379.8**	0.17	*2.75*	**1377.6**	14.53	*10.10*	**1379.8**	0.48	*4.82*	**1379.60.39**	0.92	*11.46*	1378.8	1.1	8.08	4.02
			1373.6	0.66	*10.80*	**1370.7**	12.26	*8.52*	**1373.6**	0.96	*9.64*	**1373.7**	0.37	*4.64*	1372.9	1.5	8.40	2.67
	103.40	*100*		*6.15*	*100*		*143.87*	*100*		*9.98*	*100*		*8.07*	*100*				

ANNEXE 8

% DES AIRES - REGION 1200 -850 cm-1 -
groupe témoin VC RML et groupe ayant participé au vol spatial F RO

RATS ISSUS DU VIVARIUM (28 jours)

MOYENNE cm-1	% aire 11RML	% aire 12RML	% aire 13RML	% aire 14RML	% aire 15RML	moyenne aires	écart-type
1171	3.6	1.0	1.2	2.5	2.0	2.1	*1.0*
1158	5.5	6.2	5.5	5.5	4.5	5.4	*0.6*
1121	1.3	1.0	0.9	3.6	3.9	2.1	*1.5*
1104	6.5	12.2	11.0	4.5	5.9	8.0	*3.4*
1084	13.6	15.1	13.6	19.6	21.2	16.6	*3.5*
1063	5.7	10.2	9.2	9.8	8.8	8.7	*1.8*
1047	12.8	9.1	8.1	11.4	9.7	10.2	*1.9*
1030	6.2	8.9	7.9	6.9	4.6	6.9	*1.6*
1009	4.7	4.0	3.6	3.3	7.4	4.6	*1.6*
996	6.4	2.2	1.6	1.6	2.0	2.8	*2.0*
973	0.9	3.1	2.9	6.6	10.5	4.8	*3.8*
959	9.5	4.4	5.9	3.5	2.7	5.2	*2.7*
949	2.8						
934	3.4	4.2	5.5	4.6	4.1	4.4	*0.8*
920	3.3	4.4	4.9	4.1	4.0	4.1	*0.6*
906	1.4	0.1	0.1	0.0	0.0	0.3	*0.6*
897	3.1	8.7	13.4	3.1	1.1	5.9	*5.1*
877	9.3	5.1	4.6	9.5	7.5	7.2	*2.3*
total % aire	*100.0*	*100.0*	*100.0*	*100.0*	*100.0*		

RATS AYANT PARTICIPE AU VOL SPATIAL

MOYENNE cm-1	% aire 16 F RO	% aire 17 F RO	% aire 18 F RO	% aire 19 F RO	% aire 20 F RO	moyenne aires	*écart-type*
1172	1.0	1.1	4.1	0.9	2.3	1.9	*1.4*
1159	6.8	5.1	4.9	6.8	3.8	5.5	*1.3*
1139			1.4		0.2	0.8	*0.8*
1119	7.6	6.5	3.4	1.4	2.1	4.2	*2.7*
1105	4.9	1.8	7.8	10.1	1.5	5.2	*3.7*
1085	22.2	13.0	16.9	12.8	6.1	14.2	*5.9*
1065	13.7	8.4	7.9	7.4	5.6	8.6	*3.0*
1055		**16.0**	**12.0**	**1.7**	**5.0**	**8.7**	**6.5**
1044	9.3			8.0	0.4	5.9	*4.8*
1029	9.3	3.6	12.8	6.4	1.3	6.7	*4.6*
1009	3.8	2.3	4.0	5.2	8.3	4.7	*2.2*
997	1.4	10.4	2.6	4.5	14.1	6.6	*5.4*
988			1.8			1.8	
972	4.4	9.7	4.3	7.8	5.2	6.3	*2.4*
959	2.0	5.9	4.4	6.4	28.5	9.5	*10.8*
949			1.6			1.6	
935	2.3	5.1	2.6	7.5	1.4	3.8	*2.5*
920	2.8	4.3	3.2	4.7	6.2	4.2	*1.3*
903	2.0	1.8	1.5	2.9	2.0	2.0	*0.5*
899	0.0		1.3			0.7	*0.9*
885			1.4			1.4	
874	6.3	4.9	5.3	5.4	5.9	5.6	*0.6*
total % aire	*100.0*	*100.0*	*100.0*	*100.0*	*100.0*		

ANNEXE 9

COUPLAGE ATG - SPECTROMETRIE DE MASSE

OS CORTICAL DU RAT 14 VC RML (groupe témoin à 28 jours)

temp. °C	masse 18 H2O -18	masse 44 CO2 44	masse 28 CO -28	masse 15 CH4 -15	masse 16 NH3-CH4 -16	masse 17 NH3 -17	masse 2 H2 -2	30 NO -30	14 CH2 -14	46 NO2 -46
18	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.24E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
20	0.00E+00	8.61E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
23	0.00E+00	6.41E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
38	0.00E+00	5.19E-10	0.00E+00	1.86E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
33	0.00E+00	6.87E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
40	0.00E+00	1.19E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
49	0.00E+00	6.93E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
57	0.00E+00	1.05E-09	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
68	0.00E+00	1.79E-09	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
80	0.00E+00	2.49E-09	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.00E-10
93	0.00E+00	4.25E-09	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
105	0.00E+00	8.18E-09	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	5.83E-11
121	0.00E+00	1.30E-08	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3.34E-11
136	0.00E+00	1.90E-08	0.00E+00	1.09E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	9.76E-11
151	0.00E+00	2.75E-08	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.02E-10
170	0.00E+00	3.85E-08	0.00E+00	5.74E-11	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	2.16E-10
188	0.00E+00	5.67E-08	0.00E+00	3.62E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	2.82E-10
205	0.00E+00	8.45E-08	0.00E+00	9.23E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	5.01E-10
224	1.58E-07	1.23E-07	0.00E+00	9.44E-10	8.58E-09	4.46E-08	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	6.19E-10
242	4.24E-07	1.62E-07	0.00E+00	1.74E-09	1.60E-08	1.09E-07	0.00E+00	6.32E-10	0.00E+00	6.06E-10
261	6.51E-07	2.18E-07	0.00E+00	2.63E-09	2.33E-08	1.63E-07	0.00E+00	1.23E-09	0.00E+00	7.62E-10
279	8.50E-07	2.98E-07	0.00E+00	3.88E-09	3.43E-08	2.12E-07	0.00E+00	2.41E-09	0.00E+00	1.17E-09
297	9.85E-07	3.87E-07	0.00E+00	5.81E-09	4.14E-08	2.39E-07	0.00E+00	3.22E-09	0.00E+00	1.46E-09
316	1.03E-06	4.74E-07	0.00E+00	5.67E-09	4.99E-08	2.54E-07	0.00E+00	4.20E-09	0.00E+00	1.60E-09
334	1.04E-06	6.19E-07	0.00E+00	5.03E-09	5.68E-08	2.55E-07	0.00E+00	4.17E-09	0.00E+00	2.25E-09
350	1.06E-06	8.56E-07	0.00E+00	5.45E-09	7.46E-08	2.66E-07	0.00E+00	2.53E-09	0.00E+00	3.27E-09
370	1.07E-06	1.16E-06	0.00E+00	5.87E-09	9.39E-08	2.65E-07	0.00E+00	3.72E-09	0.00E+00	4.18E-09
392	1.10E-06	1.36E-06	0.00E+00	6.86E-09	1.11E-07	2.75E-07	0.00E+00	3.23E-09	0.00E+00	5.40E-09
407	1.18E-06	1.41E-06	0.00E+00	8.40E-09	1.15E-07	2.84E-07	0.00E+00	4.80E-09	0.00E+00	5.46E-09
425	1.21E-06	1.42E-06	0.00E+00	1.16E-08	1.19E-07	2.96E-07	0.00E+00	5.03E-09	0.00E+00	5.40E-09
443	1.22E-06	1.41E-06	0.00E+00	1.64E-08	1.24E-07	2.99E-07	0.00E+00	6.70E-09	0.00E+00	5.29E-09
459	1.21E-06	1.33E-06	0.00E+00	2.39E-08	1.26E-07	2.97E-07	0.00E+00	9.36E-09	0.00E+00	5.25E-09
476	1.16E-06	1.16E-06	0.00E+00	3.48E-08	1.29E-07	2.84E-07	0.00E+00	1.16E-08	0.00E+00	5.01E-09
493	1.07E-06	9.69E-07	0.00E+00	5.06E-08	1.31E-07	2.63E-07	0.00E+00	1.35E-08	3.20E-09	3.84E-09
510	9.56E-07	7.96E-07	0.00E+00	6.92E-08	1.42E-07	2.36E-07	0.00E+00	1.51E-08	1.83E-09	3.18E-09
525	8.11E-07	6.61E-07	0.00E+00	8.79E-08	1.53E-07	2.03E-07	0.00E+00	1.45E-08	6.41E-09	2.73E-09
542	7.01E-07	5.59E-07	0.00E+00	1.11E-07	1.70E-07	1.73E-07	0.00E+00	1.30E-08	8.06E-09	2.51E-09
558	5.66E-07	4.88E-07	0.00E+00	1.23E-07	1.80E-07	1.40E-07	0.00E+00	1.03E-08	7.51E-09	2.05E-09
575	4.39E-07	4.27E-07	0.00E+00	1.25E-07	1.78E-07	1.10E-07	0.00E+00	8.91E-09	5.28E-09	1.88E-09
590	3.26E-07	3.79E-07	0.00E+00	1.15E-07	1.60E-07	8.63E-08	9.12E-09	5.78E-09	3.75E-09	1.60E-09
606	2.27E-07	3.46E-07	0.00E+00	9.97E-08	1.37E-07	5.75E-08	1.64E-08	4.35E-09	3.66E-10	1.48E-09
621	1.25E-07	3.23E-07	0.00E+00	7.99E-08	1.14E-07	3.48E-08	2.66E-08	3.26E-09	0.00E+00	1.34E-09
635	3.36E-08	3.08E-07	0.00E+00	5.79E-08	8.40E-08	1.87E-08	3.38E-08	2.56E-09	0.00E+00	1.36E-09
650	0.00E+00	3.04E-07	0.00E+00	4.07E-08	6.30E-08	0.00E+00	4.28E-08	1.32E-09	0.00E+00	1.27E-09
665	0.00E+00	2.96E-07	0.00E+00	2.88E-08	4.29E-08	0.00E+00	5.29E-08	7.32E-10	0.00E+00	1.20E-09
679	0.00E+00	2.83E-07	0.00E+00	1.91E-08	3.52E-08	0.00E+00	6.20E-08	1.32E-09	0.00E+00	1.13E-09
694	0.00E+00	2.63E-07	0.00E+00	1.29E-08	2.39E-08	0.00E+00	7.06E-08	7.97E-10	0.00E+00	8.67E-10
708	0.00E+00	2.38E-07	0.00E+00	9.43E-09	1.68E-08	0.00E+00	7.30E-08	1.02E-09	0.00E+00	8.13E-10
723	0.00E+00	2.15E-07	0.00E+00	7.02E-09	1.19E-08	0.00E+00	8.19E-08	1.47E-09	0.00E+00	8.69E-10
738	0.00E+00	1.80E-07	9.15E-10	5.40E-09	7.69E-09	0.00E+00	7.86E-08	4.58E-10	0.00E+00	5.85E-10
753	0.00E+00	1.46E-07	9.40E-08	5.02E-09	3.48E-09	0.00E+00	8.02E-08	6.13E-10	0.00E+00	6.16E-10
768	0.00E+00	1.23E-07	1.89E-07	4.19E-09	0.00E+00	0.00E+00	8.23E-08	1.23E-09	0.00E+00	5.08E-10
785	0.00E+00	9.83E-08	3.32E-07	3.92E-09	0.00E+00	0.00E+00	7.33E-08	1.48E-09	0.00E+00	3.97E-10
797	0.00E+00	8.57E-08	3.97E-07	3.55E-09	0.00E+00	0.00E+00	7.11E-08	2.00E-09	0.00E+00	4.41E-10

ANNEXE 9

COUPLAGE ATG - SPECTROMETRIE DE MASSE

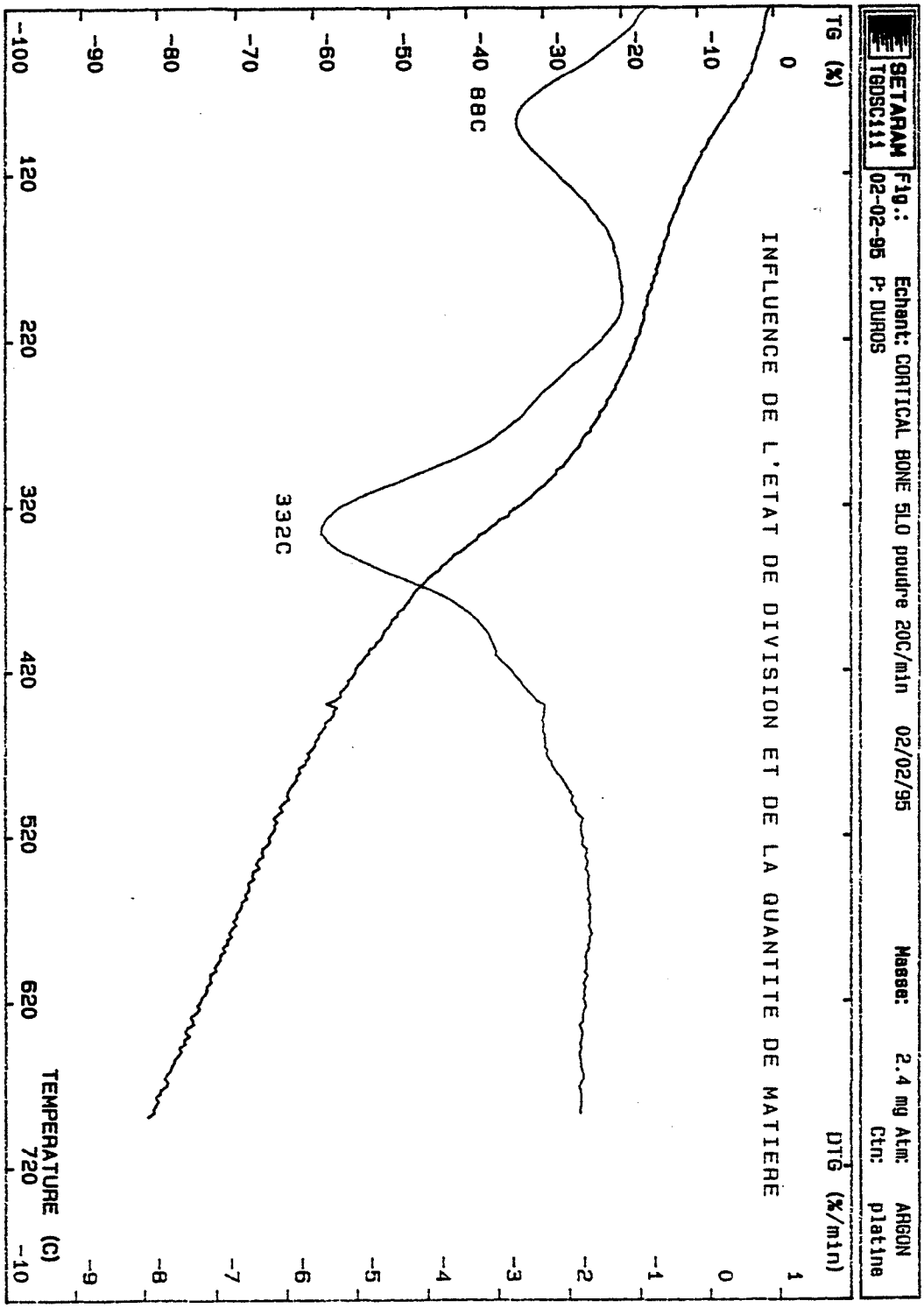
OS TRABECULAIRE DU RAT 14 VC RML (groupe témoin à 28 jours)

températures °C	18 H2O - 18-	44 CO2 - 44	28 CO - 28	15 CH4 - 15	16 NH3-CH4 -1	17 NH3 -17	32 O2- 32	2 H2 -2	30 NO - 30	46 NO2- 46
18	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
20	0.00E+00	1.55E-09	0.00E+00	2.33E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	7.11E-09	0.00E+00	0.00E+00
23	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	6.71E-09	0.00E+00	0.00E+00
28	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	2.99E-09	0.00E+00	0.00E+00
34	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	5.34E-09	0.00E+00	0.00E+00
42	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	4.79E-09	0.00E+00	0.00E+00
50	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	4.88E-09	0.00E+00	0.00E+00
60	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
72	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
84	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
97	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	7.02E-10	0.00E+00	0.00E+00
112	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
128	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	2.81E-09	0.00E+00	0.00E+00
143	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.92E-09	0.00E+00	0.00E+00
161	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	7.32E-10	0.00E+00	1.94E-11
179	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	2.59E-11
196	8.24E-09	1.35E-09	0.00E+00	1.86E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	7.34E-11
216	4.85E-08	7.30E-09	0.00E+00	7.01E-10	0.00E+00	1.18E-08	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
234	7.26E-08	1.51E-08	0.00E+00	1.39E-10	0.00E+00	1.55E-08	0.00E+00	1.01E-09	0.00E+00	9.45E-11
253	7.66E-08	3.07E-08	0.00E+00	1.20E-09	0.00E+00	2.08E-08	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	6.61E-11
273	8.94E-08	7.07E-08	0.00E+00	1.90E-09	0.00E+00	2.39E-08	0.00E+00	1.10E-09	0.00E+00	1.70E-10
292	7.48E-08	1.38E-07	0.00E+00	3.60E-09	0.00E+00	2.23E-08	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	2.95E-10
311	6.71E-08	2.42E-07	0.00E+00	3.59E-09	0.00E+00	2.08E-08	0.00E+00	1.89E-09	0.00E+00	7.43E-10
330	6.62E-08	4.10E-07	0.00E+00	2.24E-09	0.00E+00	2.09E-08	0.00E+00	0.00E+00	1.68E-09	1.24E-09
349	1.08E-07	5.89E-07	0.00E+00	2.67E-09	0.00E+00	2.92E-08	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.82E-09
368	1.93E-07	6.55E-07	0.00E+00	3.47E-09	0.00E+00	5.01E-08	0.00E+00	6.23E-09	0.00E+00	2.18E-09
388	2.96E-07	5.34E-07	0.00E+00	4.81E-09	0.00E+00	7.16E-08	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.91E-09
406	4.15E-07	3.83E-07	0.00E+00	5.88E-09	0.00E+00	9.95E-08	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.40E-09
424	5.29E-07	3.06E-07	0.00E+00	7.84E-09	0.00E+00	1.29E-07	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.15E-09
442	5.83E-07	2.80E-07	0.00E+00	1.02E-08	0.00E+00	1.47E-07	0.00E+00	2.96E-09	5.95E-10	8.76E-10
460	6.21E-07	2.97E-07	0.00E+00	1.55E-08	0.00E+00	1.49E-07	0.00E+00	0.00E+00	3.01E-09	1.30E-09
477	6.10E-07	3.64E-07	0.00E+00	2.24E-08	0.00E+00	1.50E-07	0.00E+00	0.00E+00	5.47E-09	1.16E-09
494	5.87E-07	3.77E-07	0.00E+00	3.21E-08	9.77E-10	1.45E-07	0.00E+00	3.23E-09	7.57E-09	1.41E-09
512	5.50E-07	7.19E-07	0.00E+00	4.56E-08	2.03E-08	1.32E-07	0.00E+00	1.04E-09	2.50E-08	2.70E-09
530	5.08E-07	7.20E-07	0.00E+00	5.82E-08	2.59E-08	1.26E-07	0.00E+00	4.12E-09	6.61E-08	2.55E-09
546	4.67E-07	5.96E-07	0.00E+00	6.77E-08	3.27E-08	1.17E-07	0.00E+00	6.10E-11	8.21E-08	2.08E-09
563	4.33E-07	5.17E-07	0.00E+00	6.70E-08	3.35E-08	1.10E-07	0.00E+00	4.97E-09	7.17E-08	1.92E-09
579	3.88E-07	4.50E-07	0.00E+00	6.27E-08	2.15E-08	1.05E-07	0.00E+00	1.01E-09	7.53E-08	1.32E-09
595	3.67E-07	4.15E-07	0.00E+00	5.31E-08	1.12E-08	8.95E-08	0.00E+00	7.02E-10	7.86E-08	1.45E-09
611	2.93E-07	4.01E-07	0.00E+00	4.32E-08	0.00E+00	7.81E-08	0.00E+00	4.58E-10	7.72E-08	1.26E-09
626	2.68E-07	3.96E-07	0.00E+00	3.28E-08	0.00E+00	6.65E-08	0.00E+00	0.00E+00	7.30E-08	1.58E-09
642	2.34E-07	3.91E-07	0.00E+00	2.36E-08	0.00E+00	6.46E-08	0.00E+00	2.41E-09	6.82E-08	1.43E-09
657	1.74E-07	3.87E-07	0.00E+00	1.49E-08	0.00E+00	5.22E-08	0.00E+00	0.00E+00	6.52E-08	1.45E-09
703	8.12E-08	3.92E-07	0.00E+00	2.49E-09	0.00E+00	2.57E-08	0.00E+00	1.71E-09	6.33E-08	1.37E-09
718	5.89E-08	4.01E-07	0.00E+00	1.81E-09	0.00E+00	1.49E-08	0.00E+00	0.00E+00	6.07E-08	1.36E-09
747	0.00E+00	4.05E-07	0.00E+00	1.16E-09	0.00E+00	6.29E-09	0.00E+00	0.00E+00	6.84E-08	1.32E-09
762	0.00E+00	4.27E-07	0.00E+00	1.19E-09	0.00E+00	2.84E-09	0.00E+00	0.00E+00	6.95E-08	1.54E-09
777	0.00E+00	4.51E-07	0.00E+00	1.34E-09	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	6.69E-08	1.57E-09
791	0.00E+00	4.82E-07	0.00E+00	4.63E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	6.34E-08	1.65E-09

ANNEXE 10

ANALYSE THERMOGRAVIMETRIQUE

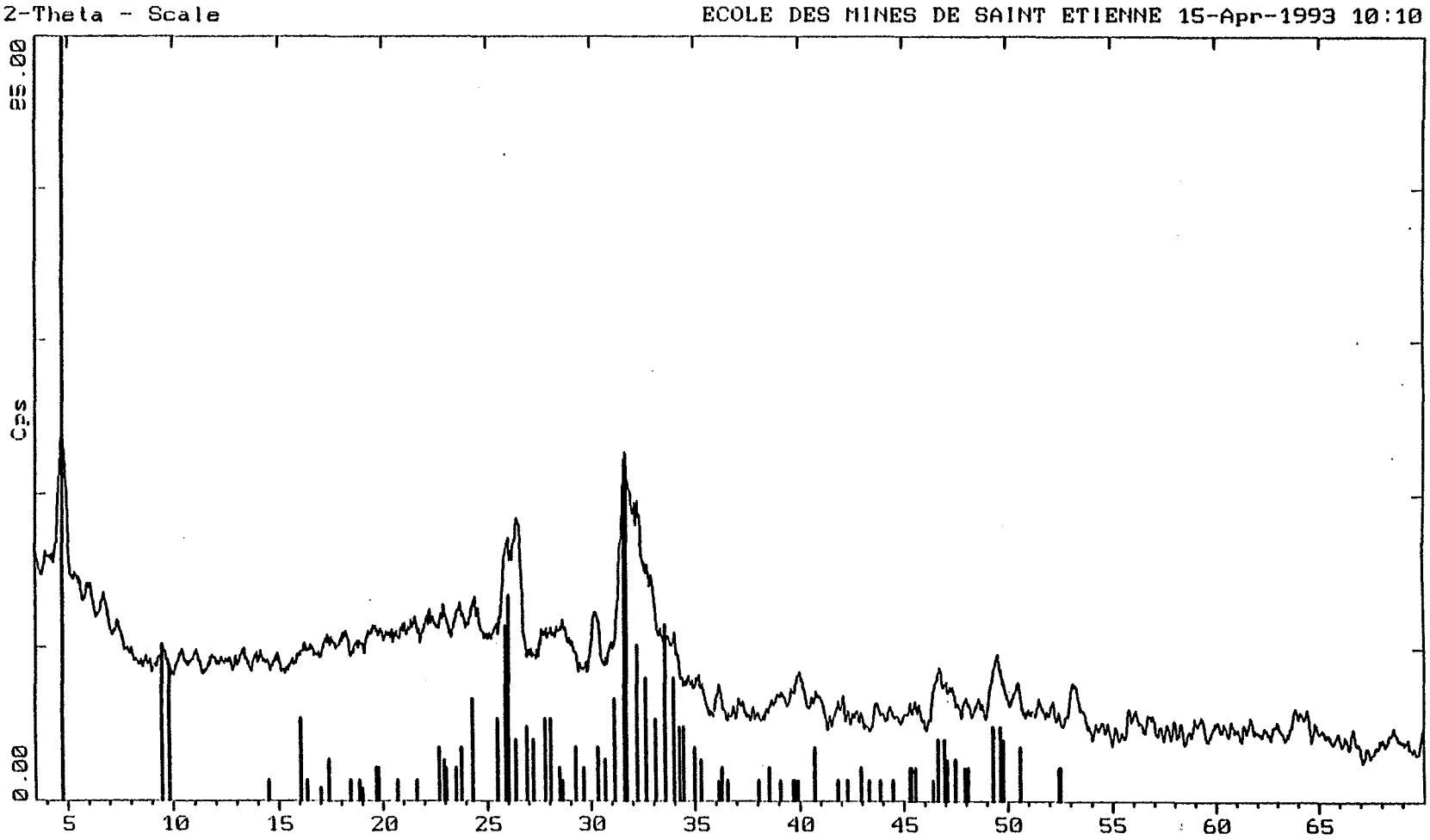
Influence de l'état de division et de la quantité de matière sur la température



ANNEXE 11

ANALYSE PAR DIFFRACTION DES RAYONS X

Contrôle de l'octacalcium phosphate préparé au laboratoire



ANNEXE 12

LES PROTEINES MORPHOGENETIQUES CONNUES

d'après A. Scott, H. Mayer, E. Wingender (1992)
New perspectives in the differentiation of bone-forming cells. Biofactors 4, 1, 1-

FACTEURS DE CROISSANCE	effet sur l'os	
	in vitro (1)	in vivo (2)
Protéines osseuses morphogénétiques		
BMP-2	+	+
BMP-3 ou ostéogénine	–	
BMP-4	+	+
BMP-5	+	
BMP-6	+	
BMP-7 ou OP-1	–	
BMP-2/OP-1		+
OIF		+
TGF-β 1/2		
Facteurs de croissance insulin-like		
IGF-1 ou somatomédine	+	
IGF-2	+	
Facteurs de croissance des fibroblastes		
aFGF	+	
bFGF	+	
Facteurs de croissance dérivés des plaquettes		
PDGF-AA, BB, AB	+	
B2- Microglobuline		
ou BDGF	+/-	
Facteurs de croissance transformant β		
TGF-β1 ou CIF A	+	+
TGF-β2 ou CIF B	+	+
TGF-β3		
TGF-β4		
TGF-β5		

(1) effet prolifératif sur les ostéoblastes ; (2) effet ostéogénique après application locale.

BMP : Bone Morphogenetic Factor , OIF : Osteoinductive factor, BDGF : Bone Derived Growth Factor, IGF : Insulin Growth Factor, CIF : Cartilage Inductive Factor, TGF : Transforming Growth Factor.

références

REFERENCES

1 BARON R. (1993) *Primer on the metabolic bone disesases and disorders of mineral metabolism* . Second edition. Publication of the American society for bone and mineral research
Anatomy and ultrastructure of bone 3-9.

2 KANAZAWA T., (ed.) (1989) *Materials science monograph* **52**, New York, Elsevier..
Inorganic phosphate materials.

3 ELLIOT J. C., MACKIE P. E., YOUNG R.A. (1973) *Science* **180**, 1055-1057.
Monoclinic hydroxyapatite.

4 ELLIOT J. C. (ed.) (1994) *Studies in inorganic chemistry* **18**, Elsevier..
Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates.

5 BROWN W. E. (ed.) (1966) *Clin. Ortho. Rel. Res* **44,** 205-220.
Crystal growth of bone mineral.

6 ELLIOT J. C. (ed.) (1973) *Clin. Ortho. Rel. Res* **93**, 313-345
The problem of the composition and structure of the mineral component of the hard tissues.

7 MEYER J. L. and FOWLER B.O. (1982) *Inorg.Chem.* **21**, 3029-3035
Lattice defects in nonstoichiometric calcium hydroxyapatites. A chemical approach.

8 NEUMAN W..E., NEUMAN M.W. (1958) *The chemical dynamics of bone mineral.* Chicago. University of Chicago Press.

9 PEREZ L. SHYU L.J., NANCOLLAS G.H; (1989) *Colloids and surfaces* **38**, 295-304.
The phase transformation of calcium phosphate dihydrate into octacalcium phosphate in aqueous suspensions.

10 OSAWA T., UJII T., TAMURA K. (1980) *J. Chem. Soc. Jpn* 1352-1357
Deshydratation of calcium hydrogenphosphate dihydrate in water.

11 LEMP R. (1971) *Chimia.* **25**, 317-325
Etude du mécanisme cinétique de l'hydrolyse de l'orthophosphate dicalcique dihydraté en hydroxylapatite.

12 TUNG. M.S., CHOW L.C., BROWN W.E. (1985) *J. Dent. Res* **64,** 2-5
Hydrolysis of dicalcium phosphate dihydrate in the presence or absence of calcium fluoride.

13 BOOTH D.H., COATES R.V. (1961) *J.Chem. Soc.* 4914-4921
The stability of calcium hydrogen phosphate precipitated from solutions of calcium nitrate and phosphoric acid.

14 BONAR L.C., GRYNPAS M.D., GLIMCHER M.J. (1984) *J. Ultrastruc. Res.* **86,** 93-99
Failure to detect crystalline brushite in embryonic chick and bovine bone by X-ray diffraction.

15 ROBERTS J.E., BONAR L.C., GRIFFIN R.G., GLIMCHER M.J. (1992) *Calci.f. Tissue Int.* **50,** 42-48
Caracterization of very young mineral phases of bone by solid state "phosphorus magic angle sample spinning nuclear magnetic resonance and X-ray diffraction.

16 ROY D. M., LINNEHAN S. K. (1974) *Nature.* **247,** 220-222
Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange.

17 LEGEROS R.Z., DACULSI G., KIJKOWSKA R., KEREBEL B. (1989) Iokawa Y. Durlach J.

(eds). Magnesium in Health and Disease. John Libbey. pp.11-19.
The effect of magnesium on the formation of apatites and whitlockites.

18 REY C., SHIMIZU M., COLLINS B., GLIMCHER M.J. (1990) *Calcif. Tissue Int.* **46,** 383-388
Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age. 1 : investigation in the n_4 PO_4 domain.

19 REY C., SHIMIZU M., COLLINS B., GLIMCHER M.J. (1991) *Calcif. Tissue Int.* **49,** 384-394
Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age. 2 : investigation in the n_3 PO_4 domain.

20 MIQUEL J. L., FACCHINI L., LEGRAND A. P., MARCHANDISE X., LECOUFFE P., CHANAVAZ M., DONAZZAN M., REY C., LEMAITRE J. (1990) *Clinical Mater.* **5,** 115-125
Characterisation and conversion study into natural living bone of calcium phosphate bioceramics by solid state NMR spectroscopy.

21 LARSEN M.J., JENSEN S. J. (1986) *Arch. Oral. Biol.* **31,** 565-572
Solubility study of the initial formation of calcium orthophosphates from aqueous solutions at pH 5-10.

22 KAUFMAN H. W., KLEINBERG I. (1977) *Calcif. Tissue Res.* **22;** 253-264
An X-ray cristallographic examination of calcium phosphate formation in $Ca(OH)_2/H_3PO_4$ mixtures.

23 WUTHIER R.E., RICE G.S., WALLACE J.E. B., WEAVER R. L., LEGEROS R. Z., EANES E. D. (1985) *Calcif. Tissue Int.* **37,** 401-410
In vitro precipitation of calcium phosphate under intracellular conditons ; formation of brushite from an amophous precursor in the absence of ATP.

24 FÜREDI-MILHOFER H., PURGARIE B., BRECEVIE LJ., PAVKOVIE N. (1971) *Calcif. Tissue Res.* **8,** 142-153
Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions. I. A study of the precipitates in the physiological pH region.

25 EANES E. D., MEYER J. L. (1977) *Calcif. Tissue Res.* **23,** 259-269
The maturation of crystalline calcium phosphates in aqueous suspensions at physiological pH.

26 TUNG M. S., BROWN W. E. (1983) *Calcif. Tissue Int.* **35,** 783-790
An intermediate state in hydrolysis of amorphous calcium phosphate.

27 CHRISTOFFERSEN J., CHRISTOFFERSEN M. R., KIBALCZYC W., ANDERSEN F. A. (1989) *J. Cryst. Growth* **94,** 767-777
A contribution to the understanding of the formation of calcium phosphates.

28 CHRISTOFFERSEN M. R., CHRISTOFFERSEN J., KIBALCZYC W. (1990) *J. Cryst. Growth* **106,** 349-354
Apparent solubilities of two amorphous calcium phosphates and of octacalcium phosphate in the temperature range 30-42°C.

29 KIBALCZYC W., CHRISTOFFERSEN J., CHRISTOFFERSEN M. R., ZIELENKIEWICZ A;, ZIELENKIEWICZ W. (1990) *J. Cryst. Growth* **106,** 355-366
The effect of magnesium ions of the precipitation of calcium phosphates.

30 TROPP M. J., BLUMENTHAL N. C., WAUGH J. S. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105,** 22-26
Phosphorus NMR study of solid amorphous calcium phosphate.

31 TERMINE J. D., EANES E. D.(1972) *Calcf. Tissue Res.* **10,** 171-197

Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations.

32 HOLT C., KEMENADE M.J.J.M. van, HARRIES J. E., NELSON L. S., BAILEY R. T., HUKINS D.W.L., HASNAIN S.S., BRUYN P.L., (1988) *J. Cryst. Growth* **92,** 239-252
Preparation of amorphous calcium-magnesium phosphates at pH 7 and characterization by X-ray absorption and Fourier Transform Infrared Spectroscopy.

33 HOLT C., KEMENADE M.J.J.M. van, NELSON L. S., HUKINS D.W.L., BAILEY R. T., HARRIES J. E., HASNAIN S.S., BRUYN P.L. (1989) *Mater. Res. Bul.l. 23* 55-62
Amorphous calcium phosphates prepared at pH 6,5 and 6,O.

34 BIENENSTOCK A., POSNER A. S. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **124,** 604-607
Calculation of the X-ray intensities from array of small crystallites of hydroxyapatites.

35 BETTS F., POSNER A. S. (1974) *Mater. Res. Bull.* **9,** 353-360
An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate.

36 ARVIEU J.C. thèse de doctorat -Université de NICE- 1972
Etude cinétique des réactions entre orthophosphates solubles et CaCO3 -Propriétés physico-chimiques des apatites phosphocalciques formées.

37 HOLT C., VAN KEMENADE M.J.J.M. (1989) *Calcified Tissue* edited by HUKINS D. W. L. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. 175-214
The interaction of phosphoproteins with calcium phosphate.

38 TERMINE J. D (1993) *Primer on the metabolic bone disesases and disorders of mineral metabolism* . Second edition. Publication of the American society for bone and mineral research
Bone matrix proteins and the mineralization process. 21-25.

39 BOSKEY A. L. (1989) *Calcified Tissue* edited by HUKINS D. W. L. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. 215-243
Phospholipids and calcification

40 WUTHIER R.E. (1982) *The role of calcium in biological systems* edited by ANGHILERI L.J., TUFFET-ANGHILERI A.M. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. 41-69
The role of phospholipid calcium - Phosphate complexes in biological mineralization.

41 YAARI A. M., SHAPIRO I. M., BROWN C. E. K. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105,** 778-784
Evidence that phosphatidylserine and inorganic phosphate may mediate transport during calcification.

42 ADDADI L., BERKOVITCH-YELLIN Z., WEISSBUCH I., VAN SHIMON L. J. W., LAHAV M., LEISEROWITZ L. (1985) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **24,** 466-485
Growth and dissolution of organic crystals with "tailor-made" inhibitors - Implications in steorochemistry and material science.

43 GLIMCHER M.J. (1984) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **304,** 479-508
Recent studies of the mineral phase in bone and its possible linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds.

44 VAN KEMENADE M.J.J.M. (1988) *Thesis of University of Utrecht.* Utrecht. The Netherlands
Influence of casein on precipitation of calcium phosphates.

45 VAN KEMENADE M.J.J.M., BRUYN P. L. (1989) *J. Colloid Interfac. Sci;*
The influence of casein on the kinetics of hydroxyapatite pricipitation.

46 UDICH H.J., HOFT H., BORNIG H. (1986) *Biomedic. Biochilm. Acta.* **45,** 703-711
Effect of phosphoprotein on precipitation and crystallization of calcium phosphate salts.

47 TERMINE J.D., EANES E.D., CONN K. (1980) *Calcif. Tiss. Res.* **31,** 247-251-
Phophoprotein modulation of apatite crystallization.

48 HUNTER G.K., GOLDBERG H.A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90,** 8562-8565
Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein

49 FEDARKO N.S., VETTER U.K., WEINSTEIN S., GEYRON ROBEY P. (1992) *Journal of cellular physiology* **151,** 215-227
Age-related changes in hyaluronan, proteoglycan, collagen and osteonectin synthesis by human bone cells.

50 CHEN T.L., BATES R. (1993) *Journal of bone and mineral research* **8,** 423-434
Recombinant human transforming growth factor b modulates bone remodeling in a mineralizing bone organ culture.

51 CHENU C., DELMAS P.D. (1994) *Editions techniques* - Encycl. Med. Chir. (Paris-France), Appareil locomoteur, 14-002-B-10 , 10 pp.
Physiologie de l'os.

52 FREEMONT A.J. (1989) *Calciied Tissue* edited by HUKINS D. W. L. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. 21-40
Histology of mineralised tissues.

53 PUZAS J. E. (1993) *Primer on the metabolic bone disesases and disorders of mineral metabolism* . Second edition. Publication of the American society for bone and mineral research 15-21.
The osteoblast.

54 MUNDY G.R. (1993) *Primer on the metabolic bone disesases and disorders of mineral metabolism* . Second edition. Publication of the American society for bone and mineral research 25-32.
Bone resorbing cells.

55 CANALIS E. (1993) *Primer on the metabolic bone disesases and disorders of mineral metabolism* . Second edition. Publication of the American society for bone and mineral research 33-37.
Regulation of bone remodeling.

56 BAUD C.A, VERY J.M. (1982) *The role of calcium in biological systems* CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. 95-106
Morphological and crystallographic analysis of bone mineral.

57 GRYNPAS M.D., BONAR L.C., GLIMCHER M.J. (1984) *J. Mater. Sci.* **19,** 723-736
X-ray diffraction radial distribution function studies of bone mineral and synthetic calcium phosphates.

58 GRYNPAS M.D., BONAR L.C., GLIMCHER M.J. (1984) *Calcif. Tissue Int.* **36,** 291-309
Failure to detect amorphous calcium phosphate solid phase in bone mineral A radial distribution function study.

59 AUE W.P. ROUFOSSE A.H., GLIMCHER M.J., GRIFFIN R.G. (1984) *Biochem.* **23,** 6110-6114.
Solid state phosphorous nuclear magnetic resonance study of synthetic solid phase of calcium phosphate ; potential models of bone mineral.

60 BONAR L.C., SHIMIZU M., ROBERTS J .E, GRIFFIN R.G., GLIMCHER M.J. (1991) *J. Bone Miner. Res.* **6,** 1167-1176
Structural and composition studies on the mineral of newly formed dental enamel. A chemical X-ray diffraction and ^{31}P and proton nuclear mangnetic resonance study.

61 MOENS P.D.W., VERBEECK R. M.H., DE VOLDER P. J., CALLENS F. J., DE MAEYER E. A.P. (1993) *Calcif. Tissue Int.* **53,** 416-423

Spectrum decomposition through maximum likelihood common factor analysis of the EPR spectra of Na^+ containing carbonated apatites dried at 400°C.

62 DOI Y., MORIWAKI Y., TAKAHASHI J., JOSHIN K. (1982) *Calcif. Tissue Int.* **34,** 178-181
ESR and IR studies of carbonate-containing hydroxyapatites.

63 MOENS P.D.W., CALLENS F. J., VERBEECK R. M.H., NAESSENS D., MATTIES P., MAES F. (1991) *J. Chem. Faraday Trans* **87,** 3137-3142
Adsorption of carbonate-containing apatites.

64 BONAR L.C., GRYNPAS M. D., ROBERTS J.E., GLIMCHER M.J;, GRIFFIN R.G. (1985) *in BUTLER Wi. T. (ed).* The chemistry and biology of mineralized tissue. Ebsco Media, Birmingham, AL pp 226-233.
Physical and chemical characterization of the development and maturation of bone mineral.

65 HAWTHORNE F.C. (ed) (1988) *Spectroscopic methods in mineralogy and geology.* Review in mineralogy . Wahington, Miner. Soc. Am. **18**
Spectroscopic methods in mineralogy and geology.

66 BINSTED N., HASNAIN S. S., HUKINS D. W. L. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **107,** 89-92
Developmental changes in bone mineral structure demonstrated by extended X-ray absorption fine structure (EXAFS).

67 HUKINS D.W.L., COX A.J., HARRIES J.E. (1986) *J. Physique* **47,** c8 1181-1184
EXAFS characterization of poorly crystalline deposits from biological systems in the presence of highly crystalline material.

68 HUKINS D.W.L., HARRIES J.E., HASNAIN S.S., HOLT C., (1986 a) *J. Physique* **47,** c8 1185-1188
Biological calcification investigation by X-ray absorption spectroscopy.

69 HARRIES J.E., HUKINS D.W.L., HOLT C., HASNAIN S.S. (1987a) *J. Cryst. Growth* **84,** 563-570
Conversion of amorphous calcium phosphate into hydroxyapatite investigated by EXAFS spectroscopy.

70 HARRIES J.E., HUKINS D.W.L., HASNAIN S.S. (1988) *Calcif. Tissue Int.* **43,** 250-253
Calcium environment in bone mineral determined by EXAFS spectroscopy.

71 HUKINS D.W.L., HASNAIN S. S., HARRIES J.E. (1989) *Calcified Tissue* edited by HUKINS D. W. L. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. 65-91
X-ray absorption spectroscopy of mineral deposits.

72 MORADIAN-OLDAK J., WEINER S., ADDADI L., LANDIS W.J., TRAUB W. (1991) *Connect. Tissue Res.* **25,** 219-228
Electron imaging and diffraction study of individual crystals of bone, mineralized tendon and synthetic carbonate apatite.

73 BAUD C.A, VERY J.M., COURVOISIER B. (1988) *Bone* **9,** 361-365
Biophysical study of bone mineral in biopsies of osteoporotic patients before and after long-term treatment with fluoride.

74 CUISINIER FJG., STEUER P., SENGER B., VOGEL J. C., FRANCK R. M. (1992) *Calcoied Tissue* **51,** 259-268
Human amelogenesis i :High resolution microscopy study of ribbon-like crystals

75 YOUNG R.A. (1988) *Aust. J. Phys.* **41,** 297-310

Pressing the limits of Rietveld method.

76 YOUNG R.A. (ed) (1993) *The oxford University Press*
The Rietveld method.

77 BRES E.F., CHERNS D., VOEGEL J.C., FRANK R.M., CUISINIER FJG. (1993) *J. Microscopy* **170,** 147-154
Observation of the loss of the hydroxyapatite sixfold symmetry in a human fetal tooth enamel crystal.

78 NELSON DGA., WOOD GJ., BARRY JC., FEATHERSTONE JDB. (1986) *Ultramicroscopy* **19,** 253-266
The structure of (100) defects in carbonated apatite crystallites : a high resolution electron microscope study.

79 EANES E.D., TERMINE J.D., NYLEN M. (1973) *Calcif. Tissue Res..* **12** 143-158
An electron microscopy study of the formation of amorphous calcium phosphate and its transformation to crystalline apatite.

80 LEGROS R., GODINOT C;, TORRES L., MATHIEU J., BONEL G. (1982) *J. Biol. Bucalle* **10,** 3-9.
Sur la stabilité thermique des carbonates du tissu osseux.

81 MAYER I., SCHNEIDER S., SYDNEY-ZAX M., DEUTSCH D. (1990) *Calcif. Tissue Int.* **46,** 254-257.
Thermal decomposition of developing enamel.

82 JACQUET J., VERY JM., FLACK HD. (1980) *J. Appl. Cryst.* **13,** 380-384
The 2 Q determination of diffraction peaks from "poor" powder samples. Application to biological apatite.

83 MUENZENBERG KJ., GEBHARDT M. (1973) *Clin. Orthop. Rel. Res.* **90,** 271-273
Brushite, octacalcium phosphate and carbonate-containing apatite in bone.

84 FARMER V.C (ed) (1974) *London mineralogical Society*
The infrared spectra of minerals.

85 BAILEY R.T., HOLT C. (1989) *Calcified Tissue* edited by HUKINS D. W. L. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. 63-121
Fourier transform infrared spectroscopy and characterization of biological calcium phosphates.

86 HOLT C., VAN KEMENADE M.J.J.M., HARRIES J.E., NELSON L.S., BAILEY R.T., HUKINS D.W.L., HASNAIN S.S., DE BRUYN P.L. (1988) *J. Cryst. growth* **92** *239-252*
Preparation of amorphous calcium magnesium phosphates at pH 7 and characterization by X-Ray absorption and Fourier transform infrared spectroscopy.

87 ELLIOT J.C (1984) *In Dickens GR (ed) ;* Methods of calcified tissue preparation. Amsterdam. Elsevier pp 413-434
Infrared and Raman spectroscopy of calcified tissue preparation.

88 WALTERS M.A., LEUNG Y.C., BLUMENTHAL NC., LEGEROS RZ., KONSKER KA., (1990) *J. Inorg. Biochem..* **39,** 193-200
A Raman and Infrared spectroscopic investigation of biological hydroxyapatite.

89 REY C., LIAN J.B., GRYNPAS M., SHAPIRO F., ZYLBERBERG L., GLIMCHER M.J. (1989) *Connect Tissue Res* **21** 267-273
Non-apatitic environments in bone mineral. FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states.

90 REY C., COLLINS B., GOEHL T., DIKSON I.R., GLIMCHER M.J. (1989) *Calcif Tissue Int* **45** 157-164

The carbonate environment in bone mineral. A resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy study.

91 REY C., RENUGOPALAKRISHNAN V., SHIMIZU M., COLLINS B., GLIMCHER M.J. (1991) *Calcif Tissue Int* **49** 259-268
A Resolution-Enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopic study of the environment of the $CO3^{2-}$ ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation.

92 PLESHKO N., BOSKEY A., MENDELSOHN R. (1991) *Biophysic J.* **60** 786-793
Novel Infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals.

93 SAUER GR., WUTHIER R.E. (1988) *J. Biol.. Chem.* **263** 13718-13723
Fourier Transform Infrared characterization of mineral phases formed during induction of mineralization by collagenase-released matrix vesicles.

94 BENEDETTI E., THEODORI L., TRINCA M.L., VERGAMINI P., SALVATI F.,, MAURO F., SPREMOLLA G. (1990) *Applied Spec.* **44** 1276-1280
A new approach to the study of human solid tumor cells by means of FT-IR microscopy.

95 BOSKEY A., PLESHKO N., DOTY S., MENDELSOHN R. (1992) *Cells ans materials* **2** 209-220
Applications of Fourier Transform Infrared (FT-IR) microscopy to the study of mineralization in bone and cartilage.

96 BOSKEY A.L., PLESHKO CAMACHO N., MENDELSOHN R., DOTY S.B., BINDERMAN I (1992b) *Calcif. Tissue Int.* **51** 443-448
FT-IR microscopic mapping of early mineralization in chick limb bud mesenchymal cell cultures.

97 DAUDON M., MARFISI C., LACOUR B., BADER C. (1991) *Clin. Chem.* **37** 83-87
Investigation of urinary crystals by Fourier Transform Infrared Microscopy.

98 LANG P.L., KATON J.E., BONANNO A.S., PACEY G.E. (1988) *in Infrared microspectrometry . Theory and applications.* Messerschmidt RG., Harthcock MA. (eds), Marcel Dekker NY. page 41-72.
The identification and characterization of polymer contaminants by infrared microscopy.

99 MENDELSOHN R., HASSENKHANI A., DICARLO E., BOSKEY A.L. (1989) *Calcif. Tissue Int* **44** 20-24
Microscopy of endochondral ossification at 20 µm spatial resolution.

100 PLESHKO NL., BOSKEY A.L., MENDELSOHN R. (1992a) *Calcif. Tissue Int* **51,** 72-77
An FT-IR microscopic investigation of the effects of tissue preservation on bone.

101 DAUPHIN Y. (1993) *Applied Spectroscopy* **47, 1** 52-55
Potential of the Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT). Method in paleontological studies of bones.

102 GUIGNANDON A., VICO L., ALEXANDRE C., LAFARGE-PROUST M.H (1995) *Cell structure and Function (in press).*
Shape changes of osteoblastic cells (Ros 17/2.8) under gravitational variations during parabolic flight. - relationship with PGE2 synthesis -

103 DE HASETH J.A., ISENHOUR T.L. (1977) *Anal. Chem.* **49,** 1977

104 GRIFFITH W.P. (1970) *Eur. J. Chem. Soc.* **A,** 286-291
Raman studies on rock-forming minerals. Part II. Minerals containing MO_3, MO_4 and MO_5 groups

105 KRAVITZ L.C, KINGSLEY J.D., ELKIN E.L. (1968) *J. Chem. Phys.* **49,** 4600-10
Raman and infrared studies of coupled phosphate vibrations.

106 FOWLER B.O. (1974) *Inorg. Chem.* **13,** 194-207
Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium and barium hydroxyapatite utilizing isotopic substitution.

107 BADDIEL C.B., BERRY E.E. (1966) *Spectrochim. Acta* **22,** 1407-1416
Spectra structure correlations in hydroxy and fluorapatite.

108 BROWN W.E. (1966) *Clin. Ortho. Rel. Res.* **44,** 205-220
Crystal Growth of bone mineral.

109 ARENDS J., CHRISTOFFERSEN J., CHRISOFFERSEN MR., ECKERT H., FOWLER B.O., HEUGHEBAERT J. C., NANCOLLAS G. H., YESINOWSKI J.P., ZAWACKI S.J. (1987) *J. Cryst. Growth* **84,** 515-532.
A calcium hydroxyapatite precipitated from an aqueous solution. An international multimethod analysis.

110 FOWLER B.O., MORENO E.C., BROWN W.E. (1966) *Arch. Oral. Biol.* **11,** 477-492
Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate.

111 FOWLER B.O., MARKOVIE M., BROWN W.E. (1993) *Chem. Mater.* **5,** 1417-1424
Octacalcium phosphate. 3. Infrared and Raman vibrational spectra.

112 BERRY E.E., BADDIEL C.B. (1967) *Spectrochim. Acta* **23A,** 2089-2097
The infrared spectrum of dicalcium phosphate dihydrate (brushite).

113 CASCIANI F., CONDRATE R.A., (1979) *Spectroscop. Lett.* **12,** 699-713
The vibrational spectra of brushite, CaHPO4, 2 H2O.

114 DEPECKER C. (1988) Thèse n° **241** de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois
La reflection diffuse associée à la spectrométrie IRTF : une nouvelle étape dans l'analyse "in situ" des composés solides.

115 KUBELKA V. P., MUNK F. (1931) *Zeitschrift für tecnische Physik.* **112,** 593-603
Ein beitrag zur optik der farbanstriche.

116 KUBELKA V.P. (1948) *Journal of the optical society of Ameriica* **38,** 9, 448-457.
New contributions to the optics of intensely light-scattering materials.

117 SAUER G. R., ZUNIC W. B., DURIG J. R., WUTHIER R. E. (1994) *Calcif. Tissue Int.* **54,** 414-420
Fourier transform Raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates.

118 VETTER U., EANES E.D., KOPP J.B., TERMINE J.D., ROBEY G.P. (1991) *Calcif. Tissue Int.* **49,** 248-250
Changes in apatite crystal size in bones of patients with osteogenesis imperfecta.

119 BOSKEY A. (1985) *Metab. Bone. Dis. & Rel. Res.* **6,** 173-178
Lipid changes in the bones of the healing vitamin D deficient, phosphate deficient rat.

120 BOSKEY A., MARKS S. (1985) *Calcif. Tissue Int.* **37,** 287-292
Mineral and matrix alterations in the bones of incisors-absent (ia/ia) osteopetrotic rat.

121 BOSKEY A. (1990) *The orthopedics clinics of North America* **21,** 19-29
Bone mineral and matrix : Are they altered in osteoporosis?

122 BOSKEY A., DI CARLO E.F., GILDER H., DONNELLY R., WIENTROUB S. (1988a) *Bone* **9,** 309-318
The effect of short-term treatment with vitamin D metabolites on bone lipid and mineral compositon in healing vitamin d-deficients rats.

123 CHANTRAINE P., VERY J.M., BAUD C. A.,(1990) *Clinical orthopaedics and related research 255,* 289-292
A Biophysical study of post-traumatic ectopic ossification. A case report.

124 COHEN L., KITZES R. (1981) *Israel J. Med. Sci.* **17,** 1123-1125
Infrared spectroscopy and magnesium content of bone mineral in osteoporotic women.

125 BAUD C.A., GOSSI M., TOCHON-DANGUY H.J., VERY J.M. (1980) *Rhumatologie* **32**, 8, 201-204
Biophysical study of the mineral substance of compact bone tissue in ageing and osteoporosis

126 GRYNPAS M.D., ACITO A., DIMITRIU M., MERTZ B.P., VERY J.M. (1992) *Osteoporosis Int.* **2**, 74-81
Change in bone mineralization, architecture and mechanical properties due to long-term (one year) administration of Pamidromate (APD) to adult dog.

127 REY C., LIAN J., GRYNPAS M.D., SHAPIRO F., ZYLBERBERG L., GLIMCHER MJ. (1989) *Connect. Tissue Res.* **21**, 267-273.
Non-apatic environments in bone mineral FTIR detection biological properties and changes in several disease states.

128 KAUPPINEN J.K., MOFFAT D.J., MANTSCH H.H. (1981c) *Appl. Spect.* **35,** 271-276
Fourier Self-Deconvolution : a method for resolving intrinsically overlapped bands.

129 HEINICKE G.. (1984) *Akademie Verlag BERLIN - Carl Hanser Verlag München WIEN*
Tribochemistry

130 MOENKE (1962) *I Academie-Verlag, BERLIN*
Mineralspektren

131 BAUD C.A. ,.(1965) *C. R. Acad. Sc. Paris.* **260,** 3590-3591
Etude par diffraction des rayons X de la fixation in vivo du strontium dans la substance minérale osseuse.

132 BAUD C.A. ,. BANG S. , VERY J.M., (1977) *Jour. Biol. Buccale.* **5,** 195-202
Minor elements in bone mineral and their effects on its solubility.

133 HUNT J.M., WISHERD M.P., BONHAM L.C. (1950) *Anal. Chem.***22,** 1478-1497
Infrared absorption spectra of minerals and other inorganic compounds.

134 BAUMER A. , GUILHOT B., GIBERT R., VERNAY A.M., OHNENSTETTER D. 1994) *C. R. Acad. Sc. Paris.* **319, série II** 193-200
Détection des ions chlore et fluor dans les apatites par spectrométrie infrarouge.

135 BAUMER A. , GIBERT R., VERNAY A.M., LAPRAZ (1995) *C. R. Acad. Sc. Paris (sous presse)*

136 OZAKI Y., MIZANO, A., and KANEUKI F. (1992) *Applied Spectroscopy* **46**, 4, 626-630
Structural differences between type I and type IV collagen in biological tissues, studied, *in vivo* by attenuated total reflection/Fourier transform

137 CHERNYSHOVA I.V., T6LSTOV V.P. (1995) *Applied Spectroscopy* **49**, 5, 665-672
New technique for ATR-FT-IR spectra measurements of adsorbed layers on a solid-phase/liquid Boundary;

138 AXELSEN P.H., BRADDOCK W.D., BROCKMAN H.,L., JONES G. M., DLUHY R.A., KAUFMAN B.K.. (1995) *Applied Spectroscopy* **49**, 4, 526-531
Use of internal reflectance infrared spectroscopy for the *in situ* study of supported lipid monolayers.

139 DLUHY R.A., CORNELL D.G., (1991) *in ACS Symposium Series 447 . D.R. SCHEUING Ed. (American Chemical Society), Washington. D.C.*
Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Colloid and Interface Science.

140 FLACH C.R., BRAUNER J. W., MENDELSOHN R. (1993) *Biophys J.,* **65**, 1994

141 MEYER, J..L., and FOWLER, B.O. (1982) *Inorg.Chem.* **21**, 3029-3035
Lattice defects in nonstoichiometric calcium hydroxyapatites. A chemical approach.

142 POSNER, A..S., and PERLOFF A. (1957) *J. Res. Natl. Bur. Stand. (U.S.)* **58**, 279

143 POSNER, A..S.; STUTMAN, J. M. ; LIPPINCOTT, E. R. (1960) *Nature (London)* **188**, 486.

144 STUTMAN, J. M. ; POSNER, A..S.; LIPPINCOTT, E. R. (1962) *Nature (London)* **193**, 368.

145 WINAND, L.; DALLEMAGNE, M.J. ; DUYCKAERTS, G. (1961) *Nature (London).* **190**, 164.

146 WINAND, L.; DALLEMAGNE. M. J. (1962) *Nature (London).* **193**, 369.

147 KHUL, G.; NEBERGALL, W. H. Z. (1963) *Anorg. Allg. Chem.* **324**, 313.

148 BERRY, E. E. (1967) *J. Inorg. Nucl. Chem.* **29**, 317.

149 BERRY, E. E. (1967) *J. Inorg. Nucl. Chem.* **29**, 1585.

150 JORIS, S. J. ; AMBERT, C. H. (1971) *J. Phys. Chem.* **75**, 3167.

151 JORIS, S. J. ; AMBERT, C. H. (1971) *J. Phys. Chem.* **75**, 3172.

152 ARNOLD, P. W. (1950) *Trans. Faraday Soc.* **40**, 1061.

153 BROWN, W. E. ; LEYR, J. R. ; SMITH, J. P. ; FRAZIER, A. W. (1957) *J. Am. Chem.* **79**, 5318.

154 DRIESSENS F.C.M. (1980) *Bull. Soc. Chim. Belg.* **89**, 8,660-688 (review)
The mineral in bone, dentin and tooth enamel

155 DRIESSENS F.C.M. (1982)*Monographs in Oral Science vol 10* - Editor : Howard M. Myers, Philadelphia, Pa. -S. Karger - Basell, Mûnchen, Paris, London, New York, Tokyo, Sydney.
Mineral aspects of dentistry.

156 MARX J.L., (1980) *Science.***207**, 628-630
Osteoporosis.

157 WONG P.T.T., PAPAVASILIOU E.D., RIGAS B. (1991) *Appl. Spectroscopy.* **45**, 9, 1563-1567
Phosphodiester streching bands in the infrared spectra of human tissues and cultured cells.