Du minéral osseux aux biomatériaux, un biominéral particulier : l'apatite

Christian Rey* *professeur*

Les phosphates de calcium constituent la phase minérale majeure des tissus durs des vertébrés. Dès 1926 De Jong [1], en utilisant la diffraction des rayons X, montrait l'analogie du minéral osseux avec les minéraux de type apatitique. Toutefois, l'étude directe du minéral osseux a peu progressé durant les années qui suivirent essentiellement en raison du mauvais état de cristallisation des apatites osseuses et des difficultés techniques qui en résultaient. Ce manque d'informations physico-chimiques a permis l'émergence de diverses théories concernant la nature et le mode de formation du minéral osseux. Ainsi, le minéral a été considéré comme un mélange d'apatite et de carbonate de calcium amorphe. Les progrès les plus sensibles ont été réalisés dans les 30 dernières années, ils ont été dus aux avancées réalisées par les chimistes dans la synthèse d'apatites complexes ainsi qu'à l'utilisation de techniques d'investigation structurale de plus en plus performantes.

Le succès des apatites dans le domaine biologique - et leur incontestable supériorité par rapport à un autre biominéral répandu qu'est le carbonate de calcium - tient à des propriétés chimiques particulières qui permettent une adaptabilité beaucoup plus grande à des physiologies différentes.

Les apatites, une vaste famille dotée d'un réseau cristallin très accueillant

Les apatites sont traditionnellement représentées par la formule chimique générale :

$$Me_{10}\,(XO_4)_6\,Y_2$$

dans laquelle Me est un métal bivalent (Ca, Sr, Ba, Pb...), XO_4 un anion trivalent (PO_4, AsO_4, VO_4...) et Y un anion monovalent (F, Cl, Br, I, OH...). L'un des composés modèle de cette famille est la fluorapatite phosphocalcique

$$Ca_{10}\,(PO_4)_6F_2$$

dont la structure a été établie par Naray-Szabo dès 1930 [2] (*figure 1*).

Les apatites cristallisent généralement dans le système hexagonal. Une des caractéristiques essentielles de cette structure est sa capacité à former des solutions solides et à accepter un grand nombre de substituants. Ainsi, le calcium peut être remplacé par un autre ion bivalent, mais également par des ions monovalents (Na, K) ou trivalents (La, Eu, Ga...) ou par des lacunes. Les groupements XO_4 peuvent également être substitués par des ions bivalents (CO_3, SO_4, HPO_4...) ou tétravalents (SiO_4) ; toutefois aucune apatite possédant des sites XO_4 lacu-

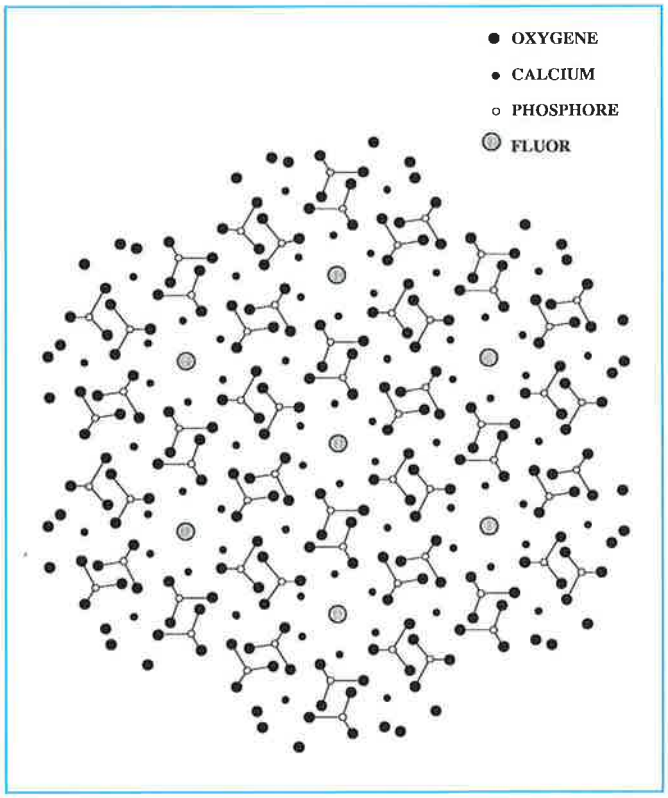

Figure 1 - **Projection sur le plan de base 001 de la structure de l'apatite, perpendiculaire à l'axe c de l'hexagone. Les ions Y sont situés dans des tunnels bordés par des ions calcium. Ces derniers forment des triangles équilatéraux aux cotes c/4 et 3c/4. Les atomes oxygène des ions phosphate forment un hexagone gauche qui borde les tunnels à la cote c/2.**

* ENSCT-INPT, Laboratoire des matériaux, physico-chimie des solides, 38, rue des 36 Ponts, 31400 Toulouse.
Tél. : 61.17.56.74. Fax : 61.55.60.65.

naires n'a été décrite. Le second site anionique Y peut aussi être occupé par des ions bivalents (CO_3, O, O_2, S...) et/ou par des lacunes. Les apatites peuvent présenter des écarts à la stoechiométrie considérables. Les lacunes cationiques peuvent concerner deux sites sur dix et les sites anioniques monovalents (Y) peuvent être totalement vacants. Ces deux types de lacunes peuvent exister dans le même composé, par exemple dans les apatites carbonatées de formule chimique [3] :

$$Ca_8 (PO_4)_4 (CO_3)_2$$

Les apatites biologiques peuvent être définies dans la plupart des cas comme des apatites phosphocalciques carbonatées plus ou moins lacunaires, de nombreux éléments mineurs et éléments traces complétant leur formule chimique. Les apatites osseuses jouent le rôle de réservoir d'ions minéraux. Elles contiennent 99 % des réserves de calcium de l'organisme et 85 % de celles de phosphore. De plus, leur aptitude à accueillir de nombreux éléments étrangers étend cette capacité : ainsi l'apatite permet le stockage de nombreux éléments minéraux essentiels, Mg, Na, K et de nombreux éléments trace. Enfin certains éléments toxiques peuvent aussi éventuellement se fixer dans le minéral apatitique d'où ils seront parfois difficilement éliminés (Pb, Ba, certains radioléléments tels ^{90}Sr).

Du fait de leur flexibilité et de leur capacité à accepter de très grands écarts à la stoechiométrie, les phosphates de calcium apatitiques ont pu s'adapter à différents tissus : l'émail dentaire, le minéral des os, des écailles de certains poissons et, dans les cellules, les granules minéraux de certaines mitochondries. La composition chimique des apatites biologiques varie largement selon les espèces, les tissus considérés, l'âge des individus, le régime alimentaire : cette variabilité traduit une adaptabilité assez extraordinaire, unique chez les biominéraux.

Une germination et une croissance cristalline sous contrôle

La minéralisation d'un tissu vivant peut être décrite comme un phénomène catastrophique, irréversible ; elle est généralement circonscrite à un espace bien délimité par des membranes protéiques. Les cristaux d'émail dentaire, par exemple, sont gainés d'une protéine qui dirige et contrôle leur croissance. Les mêmes processus sont utilisés par la plupart des organismes pour générer et limiter la croissance de leurs tissus calcifiés. L'apatite, toutefois, peut se trouver, comme dans l'os, étroitement associée à une matrice organique de façon à former un véritable matériau composite aux propriétés mécaniques assez extraordinaires, doté d'une faible densité (2,3 grammes par cm^3 au maximum pour l'os compact, beaucoup moins pour l'os spongieux). L'ossification nécessite la formation d'une matrice organique faite de fibres serrées de collagène. Les fibrilles de collagène formées dans le milieu extracellulaire s'organisent spontanément en un réseau délimitant des zones à trous dans lesquels débute la calcification (*figure 2*). Il est généralement admis que des protéines ou des environnements particuliers (esters phosphatés de la thréonine et de la sérine) favorisent la nucléation du minéral à l'intérieur même des fibres. La minéralisation s'étend ensuite progressivement à l'espace interfibrillaire, puis au tissu tout entier [4]. Les mécanismes exacts de ce phénomène sont encore assez mal connus.

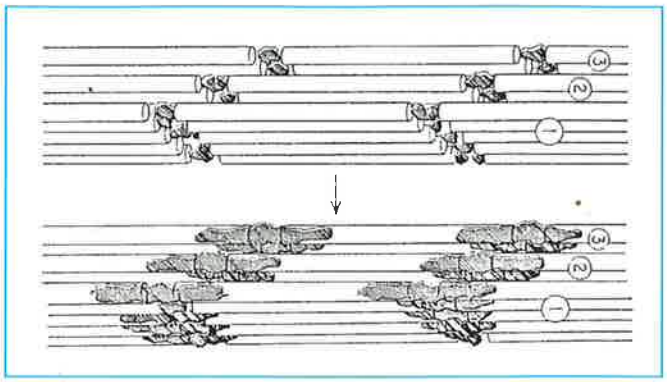

Figure 2 - **Les fibres de collagène sont arrangées de façon à ménager des zones à trou où débute la calcification (d'après W. Landis). Les cristaux minéraux ont leur axe c parallèle à l'axe des fibres de collagène.**

La minéralisation conduit à un léger accroissement du diamètre des fibres et est associée à un départ simultané d'eau.

Le phénomène de minéralisation débute au cœur même des fibres. Il nécessite l'apport d'ions minéraux et la formation de germes cristallins. De nombreuses protéines classées soit comme inhibiteurs de croissance cristalline, soit comme agents de nucléation semblent réguler le phénomène. L'inhibition se faisant par adsorption à la surface des cristaux en croissance, il est probable que les premiers germes cristallins mobilisent les molécules inhibitrices, facilitant d'une part la minéralisation de sites plus éloignés et préservant, d'autre part, les voies de diffusion ionique dans la matrice collagénique. Les deux types de molécules inhibitrice et initiatrice de germination se trouvent donc en concentration élevée dans les sites de première minéralisation. Par ailleurs, certaines protéines ont un rôle ambivalent, agissant comme inhibiteur de croissance cristalline en solution et agent de nucléation lorsqu'elles sont fixées à une matrice. L'activité des protéines aux sites mêmes de formation cristalline reste cependant déterminée par les problèmes de diffusion au sein du réseau de fibres de collagène, et il est probable que leur zone d'influence est limitée par leur faible mobilité comparée à celle des ions minéraux. Par ailleurs, les espaces laissés libres pour la calcification dans la matrice organique présentent de très faibles dimensions et ne peuvent s'accommoder que des cristaux de petite taille. Aussi existe-t-il d'autres inhibiteurs ioniques de la croissance cristalline tels que les ions carbonate, Mg ou pyrophosphate. Ces ions peuvent, comme les ions phosphate et calcium, diffuser dans les espaces interfibrillaires et limiter la croissance cristalline de l'apatite. L'activité de ces ions a pu être mise en évidence *in vitro*. L'ensemble du processus complexe d'ossification est sous l'étroit contrôle cellulaire des ostéoblastes, responsables de la formation du tissu osseux.

Les cristallites d'apatite biologique se présentent sous des formes très diverses, allant de parallélépipèdes irréguliers de très faibles dimensions dans l'os (200-500 Å de long, 150-300 Å de large et 20-50 Å d'épaisseur) à des cristaux aciculaires de grandes dimensions groupés en fibres denses dans l'émail dentaire. Les cristaux du minéral osseux présentent une surface spécifique élevée et paraissent très réactifs. Ils sont par ailleurs imbriqués dans une matrice organique difficile à éliminer et leur étude directe s'en trouve affectée.

L'une des principales caractéristiques des apatites, qui les distingue des autres biominéraux, est leur capacité à évoluer.

Un minéral évolutif

Les biominéraux apatitiques ne présentent pas une composition figée au moment de leur formation. Les tous premiers cristaux d'apatite formés dans de nombreux systèmes biologiques (émail dentaire, cartilage calcifiant, os, culture cellulaire) présentent des compositions et des caractéristiques structurales étonnamment semblables qui justifient l'hypothèse d'un précurseur commun. Ces cristaux montrent une composition très proche de celle du phosphate octacalcique (OCP) :

$$Ca_8\,(PO_4)_4\,(HPO_4)_2,\,5\,H_2O$$

Ils sont riches en ions HPO_4 mais renferment aussi toujours des ions carbonate en faible quantité. Selon les tissus, l'apatite évolue très différemment et ce sont essentiellement ces voies de maturation qui lui donnent ses caractéristiques finales. Dans l'os, les premiers dépôts minéraux, très instables, évoluent vers la formation d'une apatite de plus en plus carbonatée et de mieux en mieux cristallisée. Par ailleurs, ce phénomène de maturation est régulièrement interrompu par la dissolution complète du tissu et sa reformation. L'os est en perpétuelle démolition et reconstruction grâce à l'action de deux types de cellules : les ostéoclastes, chargés de la destruction de l'os vieux et les ostéoblastes chargés de la reconstruction d'un os neuf. Ce phénomène de renouvellement se ralentit cependant avec l'âge et le minéral a tendance à maturer de plus en plus longtemps. Les mécanismes régulateurs de ce renouvellement ne sont pas encore élucidés mais il n'est pas impossible que la maturation des apatites y soit impliquée ; en effet, un minéral osseux trop bien cristallisé et peu réactif ne serait plus à même de remplir ses fonctions. Ces modifications de la composition minérale ne semblent cependant pas affecter la formule globale du minéral : comme l'ont proposé Legros et coll. [5], on peut représenter le minéral osseux par une formule unique :

$$Ca_{8,3}\quad (PO_4)_{4,3}\,(HPO_4,CO_3)_{1,7}\quad (OH,CO_3)_{0,3}$$

Avec l'âge, le rapport CO_3/HPO_4 augmente sensiblement, mais le minéral reste très lacunaire.

La maturation de l'émail dentaire suit une voie différente. On observe toujours une amélioration de l'état cristallin avec le développement du tissu, comme pour l'os, mais ici la croissance cristalline peut être considérable. Les apatites perdent une grande partie de leurs anions bivalents (HPO_4,CO_3) et deviennent de moins en moins lacunaires. La composition moyenne d'un émail dentaire humain peut être représentée par une formule chimique beaucoup plus proche de la stoechiométrie :

$$Ca_{9,4}\quad (PO_4)_{5,4}\,(HPO_4,CO_3)_{0,6}\quad (OH,CO_3)_{1,4}$$

bien que, dans le cas de l'émail, il existe une plus grande variabilité que pour le minéral osseux. Dans certains cas, le produit final est pratiquement une apatite stoechiométrique, parfois fluorée (émail dentaire de requin) extrêmement stable et résistante à l'attaque acide.

Ces deux exemples traduisent l'adaptabilité du minéral à sa fonction : l'os tissu vivant remodelable, réservoir d'ions, est constitué de microcristaux lacunaires faciles à dissoudre, alors que l'émail dentaire, acellulaire, qui doit résister aux agressions externes (bactéries, abrasion, nourritures acides) est, normalement, une apatite pratiquement stoechiométrique, très bien cristallisée.

Le problème du précurseur minéral

Les apatites phosphocalciques ont une vitesse de croissance cristalline très faible et leur formation *in vitro* est généralement précédée de la précipitation d'une phase amorphe qui évolue plus ou moins rapidement vers une apatite. Les phénomènes d'évolution, de maturation du minéral osseux, son mauvais état de cristallisation et les incertitudes de son identification ont amené les chercheurs à s'interroger sur sa nature. On a longtemps cru que le minéral osseux était, à l'image des modèles de synthèse, constitué d'un mélange de phase cristallisée apatitique et d'une phase amorphe. On sait aujourd'hui qu'il n'en est rien et que la phase minérale est pratiquement exclusivement une phase apatitique microcristalline, présentant de nombreux défauts. Le problème de l'existence d'un précurseur à courte durée de vie de la phase apatitique se pose néanmoins et a fait l'objet de nombreuses recherches. Le phosphate octocalcique, dont la composition chimique est, comme nous l'avons signalé, la plus proche de celle du minéral osseux, est le plus souvent proposé. Ce phosphate se forme, en effet, facilement en milieu aqueux, et peut s'hydrolyser assez aisément en apatite. Il présente une structure très proche de celle de l'apatite et donne avec celle-ci des composés mixtes constitués de couches intercalées (interlayering) d'apatite et d'OCP. La morphologie des cristallites d'apatite, les caractéristiques spectrales (IR et RMN) des premiers cristaux, leur composition suggèrent la formation d'un tel précurseur mais aucune preuve structurale n'a véritablement été apportée et les nombreux diagrammes de diffraction (rayons X, neutrons, électrons) n'ont jamais confirmé l'existence d'OCP aux tous premiers stades de la minéralisation de l'os.

Les méthodes spectroscopiques (IRTF, RMN) mettent cependant en évidence, dans les apatites biologiques, des arrangements atomiques différents de ceux des apatites cristallisées de synthèse (*figure 3*). Ces environnements, dénommés "non apatitiques", présentent des caractéristiques spectrales

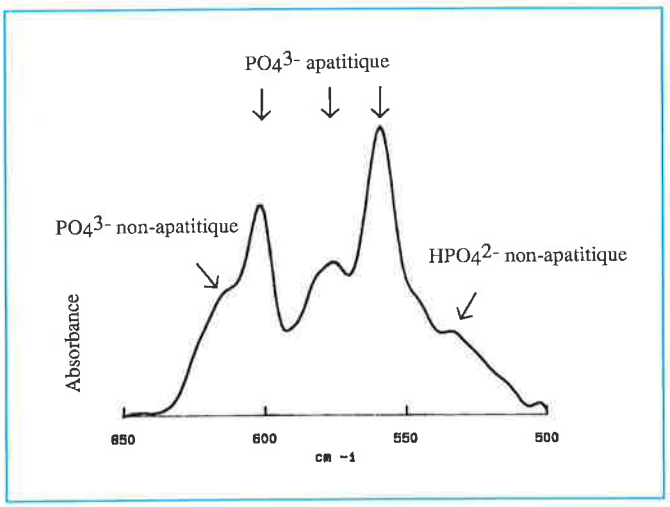

Figure 3 - **Spectre infrarouge du minéral montrant l'existence d'environnements non apatitiques des ions phosphate (os de poulet, spectre déconvolué : largeur de bande 18 cm^{-1}, coefficient de sensibilité 2,25). Les trois bandes, correspondant à l'ion PO_4 sur un site apatitique sont les plus intenses. La bande à 615 cm^{-1} est attribuée à un phosphate non apatitique, son intensité diminue avec l'âge de l'animal. La bande à 530 cm^{-1} est due à un ion HPO_4^{2-} sur un site non apatitique, probablement à la surface des cristallites.**

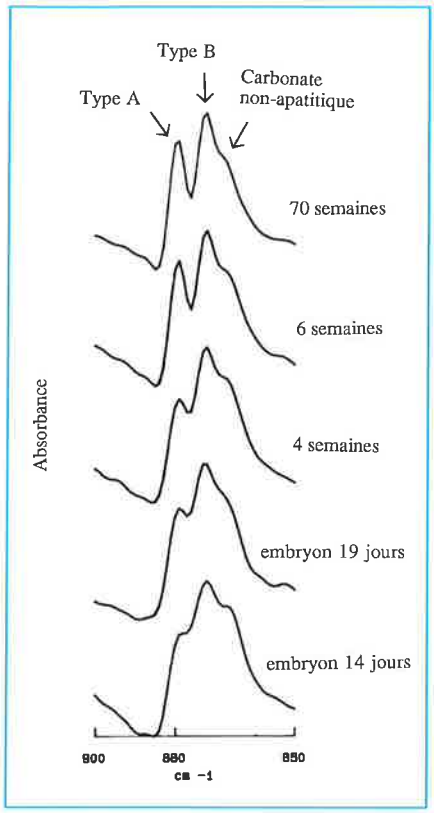

Figure 4 - **Spectres infrarouge dans le domaine ν_2 CO_3 montrant l'évolution du minéral avec l'âge (os de poulet). La résolution des bandes augmente avec l'âge et témoigne d'une amélioration de la cristallinité aussi observable sur les diagrammes de diffraction X. La bande à 879 cm^{-1} correspond à un ion carbonate sur un site Y. La bande à 873 cm^{-1} est attribuée à un ion carbonate substitué à un ion phosphate. La bande à 866 cm^{-1} est due à un ion carbonate en site non apatitique, probablement à la surface des cristallites. Cette dernière bande diminue avec l'âge, alors que le rapport A/B reste sensiblement constant, bien que la teneur en ions carbonate augmente considérablement.**

différentes de celles de l'OCP, malgré quelques analogies. La très faible épaisseur des cristaux formés aux premiers stades de la minéralisation (moins de 0,2 nm) suggère en fait la formation de "cristaux bidimensionnels" ne pouvant pas réellement être identifiés à des structures cristallines connues développées dans les trois dimensions. Le développement rapide de ces premiers dépôts minéraux conduit cependant à une structure apatitique bien identifiée et les environnements non apatitiques des premiers stades disparaissent progressivement. Ces environnements sont toujours décelables dans l'os et le cartilage alors qu'ils sont totalement éliminés dans l'émail dentaire mature. Des expériences d'échange isotopique et ionique ont démontré que certains des environnements apatitiques étaient très facilement accessibles et correspondaient probablement à des environnements situés à la surface des cristaux.

Une surface très développée et réactive

En raison de leur faible dimension, même après une phase de maturation, les cristallites de minéral osseux présentent une surface développée considérable (de l'ordre de 3 km^2 pour un adulte). Par ailleurs, malgré leur étroite association avec la matrice organique, les cristaux restent relativement accessibles et diverses réactions d'échange ont pu être observées *in vivo*. Chez les animaux en état d'acidose, par exemple, une libération quasi immédiate de carbonate a été observée pour rétablir un pH physiologique. Ces échanges rapides ont aussi pu être mis en évidence *in vitro*. Les HPO_4 et les carbonates non apatitiques résiduels, en particulier, sont aisément et rapidement échangeables. Par leur présence à la surface des cristaux, ces groupements pourraient faciliter les échanges ioniques avec les fluides biologiques.

Outre la matrice collagénique, de nombreuses protéines semblent interagir fortement avec la surface minérale et il a été montré que les modifications de cette dernière s'accompagnent d'une libération de protéines non collagéniques. Certaines de ces protéines pourraient, notamment, permettre une régulation du renouvellement osseux. Il semble exister cependant de grandes différences de réactivité superficielle selon le degré de maturation du minéral. Comme le montrent des études *in vitro*, les échanges superficiels sont d'autant plus intenses que le degré de maturation des apatites est faible. Les équilibres dynamiques impliquant le minéral osseux sont encore cependant mal connus et constituent probablement une voie de recherche à développer.

Un minéral sensible aux maladies et déséquilibres métaboliques

Le minéral osseux, en raison de sa capacité à évoluer, est extrêmement sensible aux déséquilibres affectant le renouvellement osseux. La déficience en vitamine D, par exemple, qui inhibe ce renouvellement osseux, conduit à un os faiblement minéralisé mais dont la fraction minérale paraît mieux cristallisée et plus pauvre en environnements non apatitiques qu'un os normal. Les déficiences en calcium et en phosphate conduisent également à une calcification imparfaite de la matrice organique, mais ici le minéral est riche en environnements non apatitiques et paraît très immature, comme si l'organisme faisait et défaisait l'os plus rapidement pour essayer de pallier la déficience en ions minéraux. Les éléments ayant une affinité particulière pour la phase apatitique (bone seeking elements) peuvent également modifier ses caractéristiques. Le fluor, en particulier, produit une importante altération du minéral et de ses propriétés. L'ion F^- se fixe dans le réseau cristallin et conduit à la formation d'une apatite très stable, de cristallinité élevée et très pauvre en environnements labiles. Le minéral est alors plus difficilement soluble, participe moins aux échanges ioniques et les modes de renouvellement du tissu s'en trouvent altérés.

En raison de son effet sur le minéral, le fluor a été proposé pour le traitement de l'ostéoporose (perte de substance osseuse à laquelle sont particulièrement sensibles les femmes ménauposées). Cependant bien que ce traitement conduise à une amélioration de la densité osseuse, il ne semble pas améliorer le sort des patientes dont les os restent fragiles. Ces observations indiquent clairement que la teneur en minéral n'est pas un critère déterminant des propriétés mécaniques et que la surface minérale et ses capacités d'interaction avec l'environnement protéique sont aussi à prendre en compte. Il peut être remarqué que les médications actuellement développées contre l'ostéoporose (traitement aux diphosphonates, strontium) visent au contraire à favoriser la formation d'un minéral immature. Les conséquences des modifications du minéral sur les propriétés mécaniques, et biologiques de l'os restent cependant difficiles à déduire en l'absence d'une connaissance approfondie de la dynamique des interactions minéral-organique, et de leur rôle sur les propriétés mécaniques du tissu.

En dépit de cette méconnaissance du minéral, des apatites de synthèses ont été proposées depuis quelques années comme substitut osseux. Les premiers résultats ont révélé que ces

composés facilitaient la reformation osseuse lorsqu'ils étaient au contact même du tissu (propriété d'ostéoconduction). Ces propriétés ont conduit au développement industriel rapide de biomatériaux à base de phosphates de calcium et de nombreux produits sont aujourd'hui proposés sur le marché.

Les biomatériaux à base de phosphate de calcium

Les apatites phosphocalciques sont en parfait équilibre avec les organismes biologiques des vertébrés et l'idée de l'utilisation d'apatites de synthèse comme substitut osseux a été développée il y a une vingtaine d'années dans différents laboratoires universitaires. Bien que des apatites tout à fait analogues au minéral osseux puissent être préparées, ces composés se prêtent mal à une mise en forme par les procédés hautes températures généralement employés pour les matériaux céramiques. Ils sont en effet très instables et commencent à se décomposer dès 200 °C. Aussi, les premiers biomatériaux développés ont-ils été des phosphates de calcium bien cristallisés et thermiquement stables tels l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique β, très éloignés cependant de la composition du minéral osseux et de ses propriétés. Le choix de l'hydroxyapatite résulte en fait d'une confusion au sujet de la nature réelle du minéral osseux, souvent décrit comme une hydroxyapatite dans les ouvrages médicaux, alors qu'il s'agit essentiellement d'une apatite carbonatée très pauvre en ions hydroxyde comme le montre la formule chimique mentionnée plus haut. L'hydroxyapatite, très insoluble, fournit des biomatériaux non biorésorbables et est utilisée, par exemple, pour le recouvrement de prothèses de hanche. Le phosphate tricalcique, bien qu'ayant une structure très différente de celle de l'apatite, présente une solubilité supérieure et il constitue des matériaux biorésorbables progressivement remplacés par l'os.

Ces phosphates, et plus généralement les orthophosphates de calcium, présentent de bonnes propriétés ostéoconductrices et sont aujourd'hui parmi les biomatériaux bioactifs les plus utilisés sous diverses formes, dépôts sur prothèses métalliques, blocs céramiques, poudres de granulométrie contrôlée, ciments.

La bioactivité est l'une des caractéristiques essentielles de nombreux phosphates de calcium. Schématiquement elle peut être décrite comme un processus en quatre étapes, impliquant une modification de la surface de la céramique, la nucléation d'une apatite carbonatée analogue au minéral osseux à la surface du matériau à partir de fluides biologiques sursaturés, l'adsorption de protéines, enfin, l'adhésion et l'expression de cellules ostéoblastiques.

Les céramiques mises en forme à haute température ne présentent pas généralement une surface équilibrée pour les fluides biologiques. Il se produit alors une modification de cette dernière caractérisée par l'hydrolyse superficielle d'ions PO_4^{3-} en ions HPO_4^{2-} associée à une perte d'ions Ca^{2+}, ainsi que par la fixation d'ions carbonate et sodium. Ces réactions correspondent à une mise en équilibre des premières couches atomiques de la surface avec son environnement et elles ont pu être observées, notamment, par SPX. La surface semble alors plus proche de celle du minéral osseux. Les fluides biologiques sont généralement sursaturés par rapport à l'apatite et la surface modifiée de la céramique permet la germination d'une apatite carbonatée, riche en environnments labiles, analogue au minéral osseux. Cet événement semble être la caractéristique commune de tous les matériaux ostéoconducteurs quelle que soit leur nature (polymères, bioverres). Ces cristaux néoformés de grande surface spécifique, et très réactifs, fixent alors des protéines favorisant l'adhésion cellulaire, telles que l'ostéopontine. L'interface est alors prête pour recevoir les ostéoblastes qui construiront une matrice organique puis la minéraliseront.

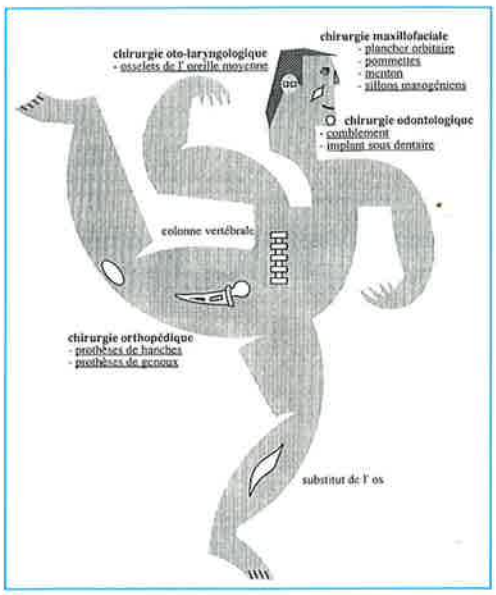

Figure 5 - **Applications biomédicales des phosphates de calcium.**

Comme on peut en juger, le substrat céramique joue essentiellement un rôle passif dans le processus. Les développements actuels visent à lui faire jouer un rôle actif, par exemple en associant au biomatériau des protéines susceptibles de favoriser le recrutement, l'adhésion, la multiplication ou l'activité cellulaire, ou même dans certains cas les cellules du patient lui-même [7]. Ces nouvelles voies de développement nécessitent cependant la mise au point de post-traitements à basse température des céramiques, dont les surfaces généralement peu développées et peu réactives conviennent mal à ce type de manipulations.

Parallèlement, des voies nouvelles de mise en forme de céramiques beaucoup plus réactives, s'inspirant des processus physico-chimiques mis en œuvre dans la construction du tissu osseux, sont explorées. Il est à noter que ces voies pourraient éventuellement conduire à la fabrication de matériaux pour des utilisations autres que biologiques. La nature sait, à partir de composés très simples et abondants, et à peu de frais, construire des édifices aux propriétés remarquables (tenue mécanique, légèreté, gradients de propriétés, autoréparation..) ; bien que les procédés utilisés soient assez lents et montrent une grande complexité, certains pourraient être imités et adaptés.

Références

[1]De Jong W.F., *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1926**, *45*, p. 445-448.
[2]Naray-Szabo S., *Zeitsch. Krist.*, **1930**, *75*, p. 323.
[3]Labarthes J.C., Bonel G., Montel G., *Ann. Chim.*, **1973**, *8*, p. 289-301
[4]Glimcher M.J., *Disorders of bone and mineral matabolism*, Ed. F.L. Coe and M.J. Favus, Raven Press, **1992**, p. 265-286 .
[5]Legros R, Balmain N, Bonel G., *J. Chem Res. Synop.*, **1986**, *1*, p. 8-9.
[6]Rey C., *Conn. Tissue Res.*, **1989**, *21*, p. 267-73.
[7]Frayssinet P., Autefage A., Primout I., Guilhem A., Rouquet N., Bonneviale P., *J. Mater. Sci.- Mater. in Med.*, **1991**, *2*, p. 217-221