

## LE CALCIUM ÉCHANGEABLE DE LA SUBSTANCE MINÉRALE DE L'OS ÉTUDIÉ À L'AIDE DE $^{45}\text{Ca}^*$

par

MARCEL J. DALLEMAGNE, PAUL BODSON ET CLAUDINE FABRY\*\*

*Institut de Thérapeutique Expérimentale, Université de Liège (Belgique)*

Le travail que nous avons entrepris pour étudier le mécanisme des réactions d'échange du calcium de la substance minérale de l'os est basé sur trois séries d'observations.

(1) La substance minérale de l'os, séparée de la fraction organique par ébullition dans la glycérine additionnée de 6% de KOH (méthode de Gabriel), immergée dans une solution renfermant du  $^{45}\text{Ca}$ , échange une partie de ses atomes de calcium avec ceux de la solution. Cette réaction d'échange *in vitro* est de la plus grande importance, car elle pourrait permettre d'élucider le rôle de réservoir à calcium que joue l'os dans l'organisme, dans la mesure tout au moins où il est possible de transposer *in vivo* les résultats obtenus *in vitro*, et dans la mesure où la réactivité des sels osseux isolés est la même que celle des sels osseux associés à leur trame organique. La réaction d'échange du calcium a fait l'objet de beaucoup moins de recherches que celle du phosphore: cependant, son étude *in vitro* permet de faire varier les conditions expérimentales beaucoup plus facilement qu'*in vivo*, car les modalités des essais ne sont plus dominées par les mécanismes régulateurs qui interviennent chez l'animal. De plus, elle peut nous amener à éclaircir certains points relatifs à la structure moléculaire des phosphates calciques.

FALKENHEIM, UNDERWOOD ET HODGE<sup>7</sup> démontrent dès 1951 que la substance minérale de l'os échange des atomes de calcium avec ceux d'une phase liquide renfermant du radiocalcium. D'après ces auteurs, cet échange est complexe et se produit en deux périodes: un échange vrai qui est un processus rapide, puis une incorporation d'isotope due à un phénomène plus lent de recristallisation. L'échange vrai est réversible et porte sur environ 14% du calcium total qui correspondraient au calcium de surface. Cependant les mesures déduites des données cristallographiques permettent à NEUMAN<sup>12</sup> de conclure que le calcium de surface ne consiste qu'en 1.72 mg de Ca/100 mg de substance minérale, soit un peu plus de 5% du calcium total.

MINDER ET GORDONOFF<sup>10</sup> ont comparé l'échange, en fonction du temps, de l'os minéralisé, de l'os calciné, de l'apatite naturelle, de mélanges calcinés ou non de phosphate tricalcique et de carbonate, et ont conclu à un comportement semblable de l'os et du mélange non calciné: ils admettent en outre que le traitement thermique provoque une profonde modification de structure de l'os et des produits de synthèse.

\* Ce travail a été réalisé grâce à l'aide de l'Air Research and Development Command, U.S. Air Force, contrat No. A.F.61(514)-647 C et grâce à des subsides provenant du Centre Interuniversitaire belge des Sciences Nucléaires.

\*\* Chercheur agréé au Centre Interuniversitaire belge des Sciences Nucléaires.

Un fait fondamental est acquis par ces résultats: la substance minérale de l'os échange des atomes de calcium quand elle est mise au contact d'une solution renfermant du  $^{45}\text{Ca}$ .

(2) Des recherches réalisées dans ce laboratoire au cours de ces dernières années, il résulte les points suivants:

a. la substance minérale osseuse soumise à une température suffisante pour transformer en oxydes les carbonates alcalino-terreux, puis immergée dans l'eau, ne libère que peu d'éléments susceptibles de donner un caractère basique à la solution: au maximum, celle-ci ne renferme que 0.5 à 0.6% du calcium total, les  $\frac{3}{4}$  du magnésium et la totalité du sodium de la substance minérale osseuse, soit les éléments adsorbés: ceux-ci sont libérés par l'augmentation du volume des particules cristallines qui résulte du traitement thermique (DALLEMAGNE, FABRY ET POSNER<sup>3</sup>).

b. le phosphate tricalcique synthétique séché à  $25^{\circ}\text{C}$ , de rapport Ca/P 1.94, immergé dans une solution de chaux, s'empare d'ions calcium de façon à accroître son rapport Ca/P jusqu'à une valeur constante de 2.26; il est à noter que celle-ci est aussi caractéristique de la substance minérale osseuse. Cette fixation est irréversible en ce sens que la substance lavée à l'eau distillée froide ou chaude conserve la même composition chimique. Le phosphate tricalcique peut en outre adsorber de la chaux mais cette adsorption est labile et ne résiste pas aux mêmes procédés d'éluution (FABRY<sup>5</sup>).

c. de ces constatations et des conclusions d'autres essais encore, est née la conception des pseudoapatites lacunaires (POSNER, FABRY ET DALLEMAGNE<sup>14</sup>). Les phosphates de calcium de synthèse, n'ayant pas subi de traitement thermique, dont le rapport Ca/P varie de 1.72 (8 Ca/6 P) à 2.26 (10  $\frac{1}{2}$  Ca/6 P), constituent une série caractérisée par une même maille cristalline, semblable à celle des apatites naturelles. Pour les termes inférieurs, la structure comporte des lacunes dues à l'absence statistique d'atomes de calcium, et elle peut être complétée si ces atomes lui sont offerts en milieu aqueux. La substance minérale de l'os répond au terme le plus élevé de la série. Ces pseudoapatites lacunaires plus ou moins saturées diffractent donc les rayons X comme les apatites minéralogiques mais s'en différencient cependant par de nombreux caractères: indice de réfraction, densité, faculté de fixer de l'eau, capacité d'adsorber d'autres ions. Les termes inférieurs de la série subissent une modification de structure à la calcination (radiogramme du phosphate  $\beta$ ); le traitement thermique ne modifie pas fondamentalement la structure apatitique des termes supérieurs, mais leur confère les autres propriétés physiques et chimiques des apatites minéralogiques. Le phosphate tricalcique neutre ( $\alpha$ ) est un élément intéressant de la série des pseudoapatites parce qu'il représente un sel neutre de structure cependant lacunaire et qu'il est une entité chimique réelle que l'on peut synthétiser de façon reproductible.

Dans le cadre de cette conception, on peut supposer que la substance minérale de l'os renferme plusieurs types d'atomes de calcium: à côté des 9 atomes du phosphate tricalcique, on y trouve ce que nous appellerons "l'excès de calcium": un roème atome de calcium qui donne au phosphate de base le rapport Ca/P des apatites, puis un demi atome de calcium supplémentaire qui amène le Ca/P de l'os à la valeur de 2.26. La possibilité de fixer ce demi atome supplémentaire est une caractéristique des pseudoapatites, les différenciant encore des apatites naturelles. Enfin, la substance minérale osseuse renferme en outre une faible quantité de calcium adsorbé.

Il n'entre pas dans nos intentions de discuter ici la nature de ce que nous appelons

les pseudoapatites et les apatites vraies: ce point fera l'objet d'autres publications.

(3) LOGAN ET TAYLOR<sup>9</sup> ont été les premiers à montrer que l'acide chlorhydrique pouvait extraire préférentiellement le  $\text{CaCO}_3$  des sels osseux: le rapport  $\text{CO}_2/\text{PO}_4$  de la phase dissoute est plus élevé que dans le solide initial, ce qui indique une mise en solution sélective du  $\text{CO}_2$ . Ce résultat a été confirmé à maintes reprises, en utilisant d'autres acides: acide acétique, acide carbonique, acide lactique (DALLEMAGNE<sup>2</sup>; CARTIER<sup>1</sup>). Depuis le travail de LOGAN ET TAYLOR<sup>9</sup>, on a beaucoup discuté la question de savoir si le  $\text{CaCO}_3$  des sels osseux est réellement une phase distincte: selon notre hypothèse, ce calcium correspondrait au 10ème et au 10e- $\frac{1}{2}$  atome de Ca de la substance minérale osseuse, c'est-à-dire à l'excès de calcium. Le fait que ce calcium se libère préférentiellement sous l'influence de HCl indiquerait une fragilité particulière de la liaison de l'excès de calcium au phosphate tricalcique de base.

Le lavage de la substance minérale osseuse par un acide aboutit au résultat inverse de celui que l'on obtient quand on immerge du phosphate tricalcique dans de la chaux: on enlève le 10ème et le 10e- $\frac{1}{2}$  calcium au lieu de les fixer à la maille.

Sur la base de ces principes, nous avons combiné une série d'expériences qui nous ont permis de préciser la nature du calcium échangeable.

#### I. ATTAQUE DE LA SUBSTANCE MINÉRALE DE L'OS PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

Notre but primitif était de reprendre les expériences de LOGAN ET TAYLOR<sup>9</sup> en nous efforçant d'obtenir le plus de sélectivité possible dans la mise en solution du  $\text{CO}_2$  et de l'excès de calcium, tout en respectant la molécule de phosphate tricalcique. Nous espérons établir une relation stoechiométrique entre le  $\text{CO}_2$  et le calcium libérés par l'acide chlorhydrique.

Nous mettons 1 g de substance minérale osseuse (poudre d'os de bovidé traité par la méthode de Gabriel) en suspension dans 50 ml d'eau à l'aide d'un agitateur magnétique; nous y ajoutons très lentement 10 ml d'une solution d'acide chlorhydrique contenant de 0.2 à 7.5 mE. Le solide est alors recueilli sur filtre taré pour déterminer la perte de poids; le  $\text{CO}_2$ , le Ca et le P sont dosés dans la phase solide, le Ca et le P dans la phase liquide.

La Fig. 1 résume les résultats obtenus. La perte de poids, proportionnelle à la quantité d'HCl utilisée, est portée en abscisse. Les plus faibles quantités d'HCl ne libèrent pas ou très peu de phosphore et le rapport Ca/P de la phase liquide est très élevé; la quantité de phosphore mis en solution augmente avec la perte de poids, mais le solide abandonne toujours un excès de calcium (en grisé sur la Fig. 1) par rapport au Ca/P théorique du phosphate tricalcique; on peut déterminer la valeur de cet excès, en multipliant le P dissous par 1.94 pour obtenir le Ca dissous appartenant au phosphate tricalcique, et en soustrayant cette quantité du Ca total trouvé dans la phase liquide. Cette quantité de calcium en excès s'accroît lentement avec la perte de poids, mais moins vite que celle du calcium appartenant au phosphate, de telle sorte que le rapport Ca/P de la phase liquide ne cesse de s'abaisser.

Le taux de  $\text{CO}_2$  de la phase solide (non repris à la Fig. 1) diminue: pour 0.2 à 1.5 mE HCl, le  $\text{CO}_2$  perdu correspond à  $\frac{1}{2}$  Ca. Au-delà de 1.5 mE HCl, pour chaque  $\text{CO}_2$ , il se libère un atome de Ca. La perte de  $\text{CO}_2$  ne dépasse pas 1.71 mg des 5.56 mg contenus primitivement dans 100 mg de substance minérale osseuse: ce maximum

est atteint alors que celle-ci a perdu 30% de son poids sous l'influence de l'acide chlorhydrique (4.2 mE HCl). Quand la quantité d'acide chlorhydrique dépasse 5.0 mE, le rapport  $\text{CO}_2/\text{Ca}$  perdus s'abaisse à nouveau; à ce moment, le taux de  $\text{CO}_2$  de la phase solide redevient égal et même supérieur à ce que la substance minérale

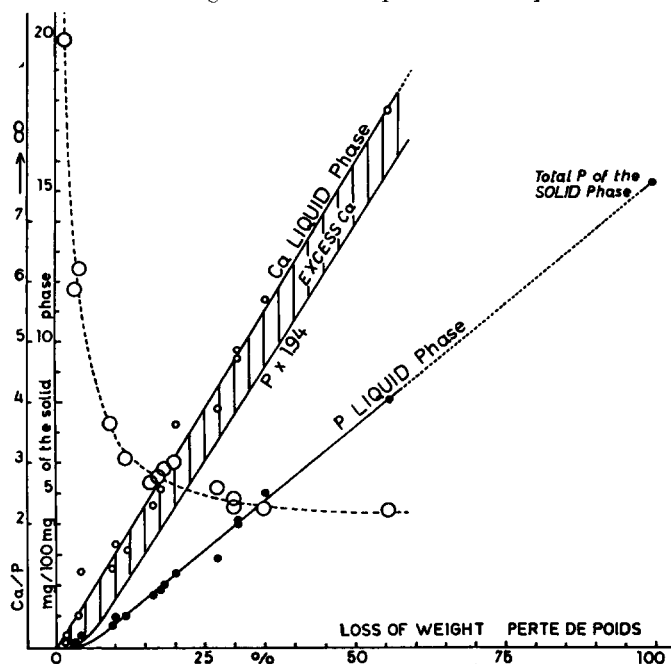


Fig. 1. Variations du rapport Ca/P de la phase solide et taux de Ca et de P de la phase liquide (ordonnées) en fonction de la perte de poids du solide (abscisse) sous l'influence de HCl. La zone en gris représente l'excès de calcium dissous.

osseuse renfermait avant le traitement chlorhydrique. Ceci est dû au fait suivant: l'attaque chlorhydrique est devenue assez importante pour accroître la concentration en ions Ca de la phase liquide de telle sorte que le produit de solubilité  $[\text{Ca}] \cdot [\text{CO}_3]$  soit dépassé: du carbonate calcique reprécipite et s'ajoute à la phase solide restante. Comme la teneur en  $\text{CO}_2$  alors déterminée est toujours rapportée à la phase solide restante et non à la quantité de départ, elle subit une augmentation apparente.

## II. RÉACTION D'ÉCHANGE DU CALCIUM DE LA SUBSTANCE MINÉRALE OSSEUSE ET DISSOLUTION PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

a. Au cours d'une première expérience, nous immergeons 5 g de substance minérale osseuse dans 50 ml d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  renfermant à la fois du  $^{45}\text{Ca}$  et du  $^{40}\text{Ca}$  (2.2 mg Ca/ml). L'activité spécifique de cette solution est  $167.5 \cdot 10^3$ . Après 7 jours de contact sous agitation constante, la substance minérale osseuse accuse une activité spécifique de  $10.0 \cdot 10^3$ . Elle renferme 36.09 mg % de Ca, 15.94 mg % de P. Son rapport Ca/P est 2.26. Trois échantillons d'un gramme de substance sont remis en suspension dans 50 ml d'eau dans laquelle on laisse couler 10 ml d'une solution d'acide chlorhydrique contenant 0.2, 1.5 et 2.65 mE HCl. L'acide chlorhydrique est ajouté goutte à goutte, sous agitation constante, en 2 heures. La phase solide est

ensuite séparée de la phase liquide sur filtre taré: elle est pesée puis dissoute dans l'acide chlorhydrique dilué. Les dosages de calcium, de phosphore et les mesures de radioactivité sont réalisés dans la phase solide et la phase liquide. Le Tableau I rassemble les résultats obtenus.

TABLEAU I

HCl mE	0,2	1,5	2,65
Phase solide: perte de poids en %	1,7	9,91	20,0
Ca/P	2,24	2,19	2,13
Rapport $\frac{c/m}{\text{mg Ca total}} (\times 10^3)$	9,29	7,88	6,06
Rapport $\frac{c/m}{\text{mg excès de Ca}} (\times 10^3)$	68,4	69,6	70,0
Phase liquide: Ca mg %	0,17	3,35	7,17
P mg %	0	0,99	2,37
Ca/P		3,38	2,79
Rapport $\frac{c/m}{\text{mg Ca total}} (\times 10^3)$	41,38	29,30	20,28
Rapport $\frac{c/m}{\text{mg excès de Ca}} (\times 10^3)$	57,0	68,6	69,9

L'activité spécifique (rapport  $c/m/\text{mg Ca total}$ ) de la phase liquide décroît en fonction de la quantité de HCl mise au contact de la substance minérale osseuse; il en est de même pour la phase solide. Mais, si au lieu de rapporter les  $c/m$  au Ca total, on les rapporte au calcium en excès, on constate que le rapport obtenu a une valeur pratiquement constante, proche de  $70,0 \cdot 10^3$ , aussi bien pour le solide restant que pour la fraction dissoute (sauf une exception, probablement due à l'imprécision

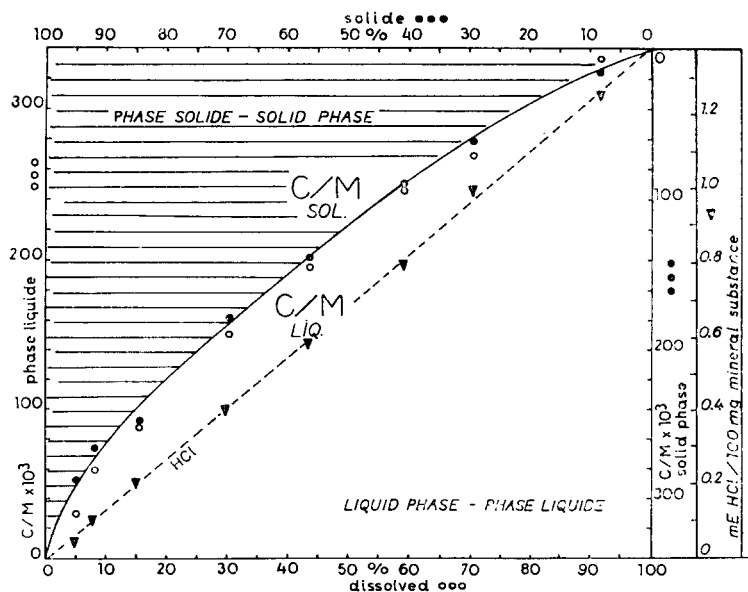


Fig. 2. Distribution du calcium radioactif ( $c/m \times 10^3$ ) entre la phase liquide et la phase solide en fonction du degré de dissolution du solide soumis à l'action de quantités croissantes d'HCl.

des dosages faits sur de faibles quantités). En outre, dans la substance minérale osseuse utilisée pour ces expériences, si on rapporte de même les c/m non plus au calcium total, mais à l'excès de Ca, on trouve un rapport c/m/mg Ca en excès de  $69.7 \cdot 10^3$ . Il nous semble donc que l'excès de calcium joue le rôle essentiel dans le processus d'échange du calcium radioactif; nous avons entamé une expérience plus complète pour nous en assurer.

b. Cinq grammes de substance minérale osseuse (de même origine que celle qui a servi aux expériences précédentes) sont immergés dans 40 ml de la même solution renfermant du calcium marqué; le contact est maintenu pendant 35 jours et la poudre est récupérée par filtration, lavée et séchée à  $105^\circ \text{C}$ . Huit échantillons de 500 mg sont humectés par 2 ml d'eau et placés sous vide pour assurer un mouillage parfait. Des volumes de 10 ml d'eau renfermant des quantités d'acide chlorhydrique variant entre 0.2 et 6.25 mE sont ensuite versés sur la poudre. La suspension est agitée énergiquement pendant 10 minutes, puis recueillie sur filtre taré et lavée rapidement. La poudre est séchée à  $105^\circ$ , pesée à nouveau, puis dissoute dans HCl. On dose le Ca, le P et la radioactivité de la

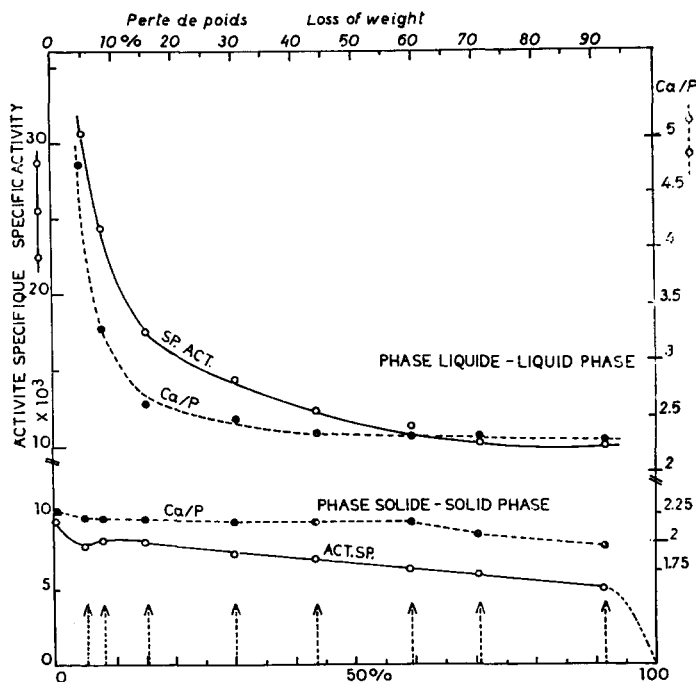


Fig. 3. Variations de l'activité spécifique et du rapport Ca/P de la phase liquide et de la phase solide en fonction de la perte de poids subie par cette dernière soumise à l'action de HCl.

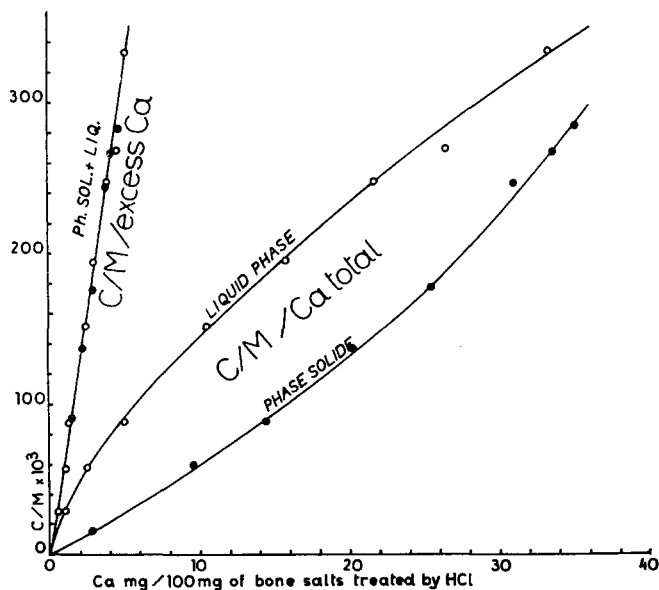


Fig. 4. Relation entre l'activité ( $^{45}\text{Ca}$ ) exprimée en c/m  $\times 10^3$  et le calcium libéré par 100 mg de sels osseux traités par HCl. La relation est calculée par les formules c/m/mg de Ca total et c/m/mg de Ca en excès.

phase liquide et de la phase solide. Cent milligrammes de la substance minérale osseuse utilisée fournissent 329,000 c/m et l'activité spécifique est  $9.11 \cdot 10^3$ .

Le degré de dissolution de la phase solide est proportionnel, dans nos conditions d'expériences, à la quantité d'HCl mise à son contact (Fig. 2): 6.25 mE HCl dissolvent 91.5% de la masse; en extrapolant, on peut établir que 6.85 mE dissoudraient les 500 mg de substance minérale osseuse. La Fig. 2 met également en évidence la répartition de la radioactivité entre la phase solide et la phase liquide. La somme des c/m des phases liquide et solide, calculée à partir des comptages expérimentaux, reste constante aux erreurs de mesure près, et correspond de façon satisfaisante aux c/m totaux du solide non attaqué par l'acide chlorhydrique. Une distribution uniforme de l'isotope radioactif entre tous les atomes de calcium de la phase solide, et une distribution égale entre la phase solide et la phase dissoute devraient donner une droite coupant le graphique en deux moitiés égales (la droite indiquant la relation entre la quantité d'HCl et la perte de poids peut servir de référence). Or ce n'est pas le cas, et la phase liquide renferme toujours plus de  $^{45}\text{Ca}$  que la phase solide. La Fig. 3 montre, en effet que l'activité spécifique de la phase liquide est très élevée pour les faibles quantités d'HCl puis elle décroît, mais elle demeure toujours plus élevée que celle de la phase solide. Cela signifie que l'acide chlorhydrique enlève préférentiellement les éléments marqués de la phase solide. Or, on sait que chimiquement ceux-ci se comportent comme le calcium non marqué: en conclusion, l'acide chlorhydrique détache préférentiellement des atomes de calcium qui se sont échangés à un degré plus élevé au cours du séjour dans la solution d'isotope.

En choisissant une échelle convenant particulièrement bien pour la comparaison (Fig. 3), on peut tracer la courbe des variations du rapport Ca/P des phases liquide et solide en fonction de la perte de poids de celle-ci sous l'influence de l'HCl ou, ce qui revient au même, en fonction de la quantité d'HCl utilisé. Les variations des rapports Ca/P suivent de très près celles des activités spécifiques.

Cela ne peut s'interpréter que d'une façon: le calcium en excès enlevé préférentiellement par l'acide chlorhydrique est l'élément qui détermine l'activité spécifique de la phase liquide.

D'ailleurs, si au lieu de calculer l'activité spécifique (aussi bien dans la phase liquide que dans la phase solide) en établissant la relation  $\frac{\text{c/m}}{\text{mg Ca total}}$ , on utilise la relation  $\frac{\text{c/m}}{\text{mg Ca excès}}$ , on obtient une valeur constante qui est, dans nos conditions d'expériences, de  $61.9 \pm 5.2 \cdot 10^3$ .

Ces modes de calcul sont représentés à la Fig. 4 qui met en relation l'activité (c/m) et la quantité de Ca mise en jeu dans les essais de dissolution par HCl: en utilisant le premier mode de calcul, on obtient deux courbes symétriques et inverses pour la phase solide et la phase liquide; en utilisant le deuxième mode, tous les points se placent sur une droite, qu'ils soient calculés à partir de la phase solide ou de la phase liquide.

D'autre part, on sait que l'acide chlorhydrique met en solution de façon préférentielle le calcium du carbonate de l'os ou du moins les atomes de calcium qui retiennent le  $\text{CO}_2$ : il s'agit du 10ème et du 10e- $\frac{1}{2}$  atome de calcium. En fait, ces derniers sont les seuls atomes échangeables et l'acide chlorhydrique peut les détacher d'une façon plus ou moins sélective.

Ajoutons encore que 100 mg de la substance minérale osseuse utilisée pour ces

essais fournissaient après le contact avec la solution d'isotope radioactif 325,000 c/m qui, rapportés à l'excès de calcium (5.17 mg) donnent le quotient de  $68.8 \cdot 10^3$ , valeur semblable aux résultats observés dans les phases liquide et solide.

c. Dans une troisième série d'expériences, nous utilisons une méthode qui nous donne des résultats beaucoup plus grossiers. La poudre d'os (300 mg) est étalée sur un papier filtre déposé sur un entonnoir de Büchner et la solution d'acide chlorhydrique s'écoule lentement d'une burette sur la poudre. Cette méthode ne permet pas d'obtenir autant de sélectivité dans la mise en solution de l'excès de calcium et cependant les résultats en sont en tous points comparables aux précédents.

TABLEAU II

HCl mE/100 mg	0.2	0.6	1.0
Phase liquide: Ca	5.24	11.14	16.25
P	2.02	4.73	6.97
Ca/P	2.59	2.35	2.33
c/m $\cdot 10^3$	75	130	183
$\frac{c/m}{\text{mg Ca total}} \times 10^3$	14.22	11.63	11.46
$\frac{c/m}{\text{mg excès de Ca}} \times 10^3$	54.7	66.1	66.9
Phase solide: Ca	35.60	36.37	33.72
P	16.04	16.38	15.26
Ca/P	2.22	2.22	2.21
c/m $\cdot 10^3$	320	302	291
$\frac{c/m}{\text{mg Ca total}} \times 10^3$	9.00	8.31	8.12
$\frac{c/m}{\text{mg excès de Ca}} \times 10^3$	71.5	65.9	70.5

### III. LE PSEUDO-ÉCHANGE ET LA RECRISTALLISATION

Les atomes de calcium radioactif dispersés dans une phase liquide se fixent donc à la substance minérale osseuse au niveau des positions occupées par les 10ème et 10e- $\frac{1}{2}$  atomes de calcium. Cette réaction est théoriquement réversible. Toutefois, lorsque la phase liquide est riche en chlorure calcique, l'activité spécifique de la phase solide dépasse nettement la valeur qu'elle devrait accuser si l'excès de calcium était seul en cause. Dans ces conditions, le phénomène n'est plus complètement réversible.

La première réaction se produit parce que les atomes de calcium servant d'intermédiaire entre le  $\text{CO}_2$  et le  $\text{PO}_4$  peuvent alternativement quitter puis rejoindre la phase solide. En ce qui concerne le deuxième phénomène, NEUMAN a supposé il y a longtemps, que la substance minérale de l'os subit une recristallisation quand elle est plongée dans une phase liquide de composition constante (NEUMAN<sup>11</sup>). Cependant, à la réunion consacrée à "Recent Advances in the Study of the Structure, Composition and Growth of Mineralized Tissues", organisée en 1954 par l'Académie des Sciences de New York, NEUMAN ET WEIKEL<sup>13</sup> paraissent ne plus distinguer les deux phénomènes: la recristallisation ne consisterait pas en une dissolution puis une reprécipitation, mais plutôt en un échange d'ions. A cette occasion, ils signalent que le phénomène n'est possible que si on invoque une structure lacunaire de la substance minérale osseuse.



Nous exposerons dans ce paragraphe les résultats expérimentaux relatifs à des sels osseux mis en contact avec une solution concentrée de  $^{45}\text{CaCl}_2$  et qui y subissent une recristallisation.

Dix grammes d'os préparé par la méthode de Gabriel et très finement pulvérisé au moulin colloïdal sont immergés dans une solution de calcium radioactif (activité spécifique  $1.404 \cdot 10^3$ ) renfermant 6.6 mg de Ca/ml sous forme de  $\text{CaCl}_2$ , soit au moins trois fois plus que dans les expériences précédentes (II. a, b, c). Le temps de contact est de 24 heures. La substance est ensuite abondamment lavée à l'eau distillée puis séchée à  $105^\circ \text{C}$ . Un gramme de poudre est ensuite introduit dans un tube à centrifuger de 15 ml et mouillé par 2 ml d'eau: on y ajoute l'acide chlorhydrique. On agite la poudre pendant 5 minutes, puis on centrifuge 2 minutes à 3.500 r.p.m. et on recueille le liquide surnageant. On lave une fois la poudre au moyen d'eau distillée; on cen-

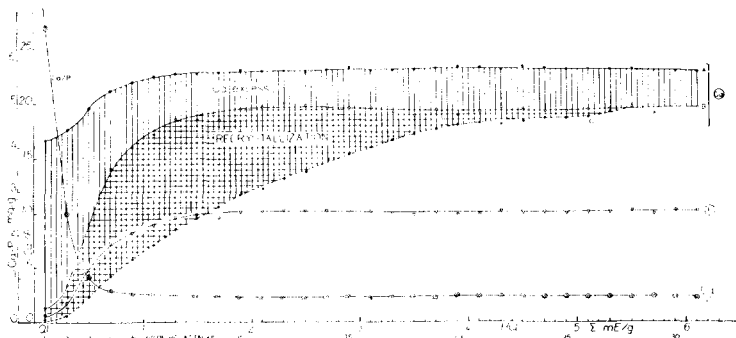


Fig. 5. Ca et P dissous par HCl et variations du rapport Ca/P de la phase liquide en fonction de la quantité de HCl utilisée. Courbe A: Ca total dissous; B: Ca total—l'excès de Ca; C: Ca total—l'excès de Ca—le Ca introduit dans le phosphate par recristallisation.

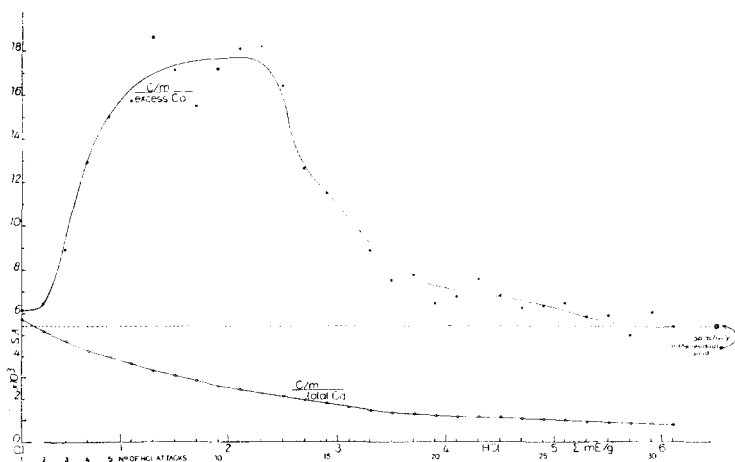


Fig. 6. Variations de l'activité spécifique de la phase liquide en fonction de la quantité de HCl utilisée, calculée par les formules  $c/m/\text{mg Ca}$  total et  $c/m/\text{mg Ca}$  en excès.

trifuge à nouveau et le liquide est ajouté au précédent. Cette opération est réalisée une fois avec 0.1 mE HCl puis 30 fois avec 0.2 mE par gramme de poudre. Les phases liquides sont soumises au dosage du calcium, du phosphore et à la mesure de radioactivité; le solide résiduel également.

Bibliographie p. 406.

Les résultats sont rassemblés aux Fig. 5 et 6: celles-ci portent en abscisse le nombre d'attaques chlorhydriques et en chaque point la somme des mE HCl appliqués au solide. À la Fig. 6, les courbes A et P représentent respectivement les quantités de calcium et de phosphore trouvées dans chaque phase liquide; les premières fractions d'acide chlorhydrique exercent leur action sélective sur l'excès de calcium, car le rapport Ca/P est très élevé dans la phase liquide. La courbe B indique la fraction du calcium mis en solution qui correspond au phosphate tricalcique; elle est obtenue en multipliant le taux de P de chaque fraction liquide par 1.94. L'espace compris entre les courbes A et B représente l'excès de calcium mis en solution, soit le 10ème et le 10e- $\frac{1}{2}$  atomes de Ca. La Fig. 6 porte la courbe exprimant les variations du rapport c/m/mg Ca total: cette courbe descend régulièrement au fur et à mesure que les attaques chlorhydriques se multiplient. Par contre, si on calcule les rapports c/m/mg excès de Ca, on obtient une courbe qui s'élève rapidement, s'abaisse, puis tend vers un plateau.

D'après les résultats rapportés plus haut, nous nous serions attendus à trouver une valeur d'activité spécifique constante (c/m/mg excès de Ca) pour l'excès de calcium passé en solution. Il est évidemment exclu d'invoquer une différence de comportement des  $^{40}\text{Ca}$  et des  $^{45}\text{Ca}$  vis-à-vis de l'acide chlorhydrique et une mise en solution préférentielle, au sein de l'excès de calcium, des atomes radioactifs. On aurait pu songer qu'une partie de l'excès de calcium (le dernier demi atome peut-être) s'était échangée à un degré plus élevé que le 10ème calcium dans les conditions expérimentales actuelles. Les valeurs les plus fortes du rapport c/m/mg excès de calcium seraient dues alors à la mise en solution préférentielle par HCl de cette partie. Mais ainsi le maximum observé, oscillant autour de  $18 \cdot 10^3$ , devrait se retrouver dès le début des attaques chlorhydriques. Or, ce n'est pas le cas, et cette éventualité doit être rejetée. D'autre part, nous avons contrôlé que les valeurs plus basses d'activité spécifique observées au début de l'expérience ne sont pas dues à ce que du magnésium, passé en solution au cours des premières attaques, aurait été dosé sous forme d'oxalate en même temps que le calcium, ce qui aurait eu comme effet d'abaisser le quotient c/m/mg Ca excès.

Il semble donc que, comme dans les expériences précédentes, les différentes fractions de l'excès de calcium se comportent de façon identique vis-à-vis du radio-isotope. Il est par conséquent logique d'admettre que des atomes de calcium autres que ceux qui forment l'excès de calcium ont été substitués par l'isotope radioactif. La valeur constante d'activité spécifique de l'excès de calcium correspond aux déterminations expérimentales du plateau de la courbe (Fig. 6), atteint après la 25ème attaque; elle est en moyenne de  $5.43 \cdot 10^3$ . La toute première attaque chlorhydrique, extrêmement sélective puisqu'il ne passe guère de phosphore en solution, ne l'est pourtant pas encore suffisamment, et donne une valeur d'activité spécifique légèrement supérieure  $6.22 \cdot 10^3$ . Enfin, cette valeur de  $5.43 \cdot 10^3$  est aussi celle que l'on obtient pour l'excès de calcium de la phase solide non encore dissoute après toutes les attaques chlorhydriques.

Enfin, une preuve supplémentaire que d'autres atomes de calcium sont échangés est que, alors que l'activité spécifique c/m/mg Ca excès est de  $5.43 \cdot 10^3$  dans le solide résiduel, elle est beaucoup plus forte dans la substance intacte au début de l'expérience puisqu'elle atteint la valeur de  $9.88 \cdot 10^3$ .

La seule explication des faits observés est la suivante: les deux premières

fractions d'acide chlorhydrique enlèvent du calcium dont l'activité spécifique est proche de celle du solide résiduel parce qu'elles n'enlèvent que peu de phosphore à la phase solide. Le rapport c/m/mg excès de Ca ne s'élève qu'au moment où le P devient abondant dans la phase liquide. Une partie du phosphate a donc capté des atomes de calcium radioactif et les libère dans la phase liquide au cours des attaques chlorhydriques. Or, nous avons établi que le phosphate tricalcique mis en présence de calcium radioactif dans une phase liquide renfermant peu de  $\text{CaCl}_2$  (concentration inférieure à 5 mE/l) n'échange pas ses atomes de Ca contre ceux du milieu ambiant; il ne le fait que si la concentration en  $\text{CaCl}_2$  est suffisante pour provoquer successivement l'hydrolyse du phosphate puis sa recristallisation. C'est précisément ce qui a dû se produire dans le cas présent.

Il est possible, pour chaque attaque chlorhydrique, de calculer la quantité de calcium "recristallisé", passé en solution puisque nous connaissons la quantité de Ca dissous, la quantité d'excès de calcium dissous, son activité spécifique apparente (valeurs expérimentales) et son activité spécifique réelle ( $5.43 \cdot 10^3$ , comme nous venons de l'établir plus haut).

La somme des valeurs trouvées pour chaque attaque correspond à la fraction du phosphate qui a été hydrolysé et a reprécipité en entraînant du calcium radioactif. Si nous faisons le bilan complet des résultats, nous obtenons les valeurs suivantes:

Ca de la substance minérale osseuse au départ	360.9 mg/g
P de la substance minérale osseuse au départ	159.4 mg/g
Ca/P de la substance minérale osseuse au départ	2.26
excès de Ca de la substance minérale osseuse au départ	51.7 mg/g
Ca total enlevé par les 31 attaques par HCl	171.5 mg/g soit 47.9% du Ca total
P total enlevé par les 31 attaques par HCl	70.1 mg/g soit 44.3% du P total
excès total de Ca enlevé par les 31 attaques par HCl	35.5 mg/g soit 9.9% du Ca total
Ca recristallisé	29.6 mg/g soit 8.2% du Ca total
Ca total du résidu solide	186.6 mg/g
P total .. ..	88.0 mg/g
excès de Ca .. ..	15.9 mg/g
Ca total retrouvé	358.1 mg/g
P total retrouvé	158.1 mg/g
rapport pondéral Ca/P du résidu solide	2.11
rapport Ca/P total de la phase liquide	2.44

Nous devons admettre que la fraction de phosphate qui a subi la recristallisation est moins vulnérable à HCl que l'excès de Ca, mais qu'elle l'est plus que la masse de phosphate demeurée intacte, puisqu'elle constitue la partie la plus externe des cristaux.

D'autre part, après avoir perdu 47.9% de son calcium, le résidu solide renferme encore 15.9 mg/g de calcium appartenant à l'excès de Ca: ce fait exclut la possibilité d'une situation de ce dernier au niveau d'une surface externe particulièrement vulnérable des cristaux. Plaide également en faveur de cette observation, le fait que le phosphate ayant subi la recristallisation s'élimine, sous l'influence de HCl, avant la totalité de l'excès de Ca.

#### IV. EXPÉRIENCES D'ÉQUILIBRE

Nous avons déjà signalé que lorsque l'équilibre est atteint, l'activité spécifique de la substance minérale osseuse rapportée au Ca total est beaucoup plus basse que celle de la phase liquide. Des déterminations d'activité spécifique dans les phases

solide et liquide à des intervalles de temps plus ou moins rapprochés, le mettent particulièrement bien en évidence.

Nous avons opéré de la façon suivante: des échantillons de 250 mg de substance minérale osseuse sont immergés (à la température de 24° C) dans 14 ml d'eau ren-

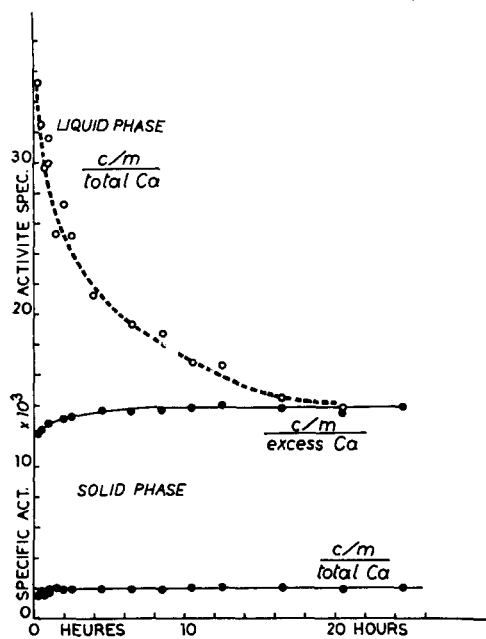


Fig. 7. Variations de l'activité spécifique de la phase liquide et de la phase solide en fonction du temps de contact du solide avec la solution contenant  $^{45}\text{Ca}$ . L'activité spécifique du solide est calculée par les formules  $c/m/\text{mg Ca total}$  et  $c/m/\text{mg Ca en excès}$ .

fermant 1.635 mg de  $\text{CaCl}_2$  marqué donnant 186,800 c/m, ce qui correspond à une activité spécifique de  $114.2 \cdot 10^3$ . Après des intervalles de temps compris entre 15 minutes et 24 heures, la phase solide et la phase liquide sont séparées par centrifugation ou filtration et l'activité spécifique est déterminée. Les résultats sont notés à la Fig. 7. L'activité spécifique de la phase liquide ne cesse de décroître et atteint un plateau après 20 heures environ: la valeur obtenue est  $13.80 \cdot 10^3$ . Par contre, l'activité spécifique de la phase solide ( $c/m/\text{mg Ca total}$ ) atteint un plateau qui se situe aux environs de  $1.95 \cdot 10^3$ . La discordance entre les deux activités spécifiques est donc très nette. Par contre, si au lieu de calculer l'activité spécifique de la phase solide en se basant sur le calcium total, on utilise la

formule  $AS = \frac{c/m}{\text{mg excès de Ca}}$ , on obtient une valeur qui est très voisine de celle de la phase liquide ( $13.80 \cdot 10^3$ ). Ceci tend à confirmer pleinement les résultats des expériences précédentes: seul l'excès de calcium est l'objet d'un échange vrai et

## CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ

Quand la substance minérale de l'os séparée des matières organiques par la méthode de Gabriel est plongée dans une solution renfermant du Ca marqué, elle échange l'excès de Ca qu'elle contient par rapport aux exigences stoechiométriques du phosphore. Ce phénomène se produit seul quand la solution marquée renferme peu de  $\text{CaCl}_2$ . Sinon, au processus d'échange vrai, il s'ajoute un phénomène d'hydrolyse suivi de recristallisation qui entraîne du calcium marqué dans le solide. Il ne faut pas se hâter d'extrapoler ces observations *in vitro* aux phénomènes qui pourraient avoir lieu *in vivo*. Si cette extrapolation était permise, il est probable que seule la fraction du calcium de l'os fixée d'une part au phosphate et d'autre part aux groupes  $\text{CO}_3$ , serait capable d'intervenir comme réserve calcique d'urgence, car elle est la seule à être mobilisable puisqu'elle est échangeable. Mais il ne faut pas sous-estimer le rôle que peut jouer la matière organique de l'os dans les échanges que celui-ci réalise. Ce problème fera l'objet de publications ultérieures.

En dehors de ces considérations biologiques, nos résultats apportent une contribution à la connaissance des capacités réactionnelles des phosphates de calcium.

## SUMMARY

Bone salts, separated from the organic part by Gabriel's method, and immersed in a solution containing tagged Ca, exchange the calcium in excess in relation to the fundamental phosphate.

Bibliographie p. 406.

This is the only process to take place when the tagged solution contains little  $\text{CaCl}_2$ . With increasing concentrations of  $\text{CaCl}_2$ , an additional process of hydrolysis, followed by re-crystallization incorporating tagged calcium into the solid takes place in addition to the true exchange process. Care must be exercised in extending the results of these experiments *in vitro* to processes which might exist *in vivo*. Should this transposition be allowed, only the fraction of bone calcium bound to both  $\text{PO}_4$  and  $\text{CO}_3$ , would probably be able to act as an emergency calcic reserve, since it is the only part which, being exchangeable, can be mobilized. Nevertheless, the role that the organic part of bone might have in the exchanges is not to be neglected. This problem will be treated in further papers. Independently of this biological aspect, however, it is submitted that the above conclusions represent a contribution to knowledge of the reactivity of calcium phosphates.

### ZUSAMMENFASSUNG

Von organischen Begleitkörpern durch die Methode von Gabriel befreite mineralische Knochensubstanz wird in eine markierte Kalzium-Lösung getaucht; dabei kann festgestellt werden, dass die Knochensubstanz den die stoechiometrische Äquivalenz ihres Phosphorgehaltes übertreffenden Kalziumüberschuss austauscht. Dieses Phänomen findet nur dann statt, wenn die markierte Lösung wenig  $\text{CaCl}_2$  enthält.

Sonst kommt zu dem tatsächlichen Austauschprozess eine Hydrolyse hinzu, gefolgt von Wiederkristallisation, welche markiertes Kalzium in die feste Substanz einführt. Man darf nicht allzu schnell aus diesen *in vitro* beobachteten Ergebnissen darauf schliessen, dass dieselben auch *in vivo* statt finden. Sollte dies jedoch der Fall sein, so könnte man annehmen, dass nur die an Phosphat- und Karbonat-Gruppen haftende Knochenkalziumfraktion als dringende Kalziumreserve eine Rolle spielt, da sie vertauschbar ist und so die einzig bewegliche Fraktion darstellt. Es darf jedoch die Rolle der organischen Knochensubstanzen in den Austauschen nicht unterschätzt werden.

Dieses Problem wird in nachfolgenden Mitteilungen behandelt werden.

Abgesehen von diesen biologischen Betrachtungen, tragen unsere Ergebnisse zu der Kenntnis der Wirkungskapazität des Kalziumsphosphates bei.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. CARTIER, *Bull. soc. chim. biol.*, 30 (1948) 73.
- <sup>2</sup> M. J. DALLEMAGNE, Thèse: *La nature chimique de la substance osseuse*, édit. Gordinne, Liège, 1943.
- <sup>3</sup> M. J. DALLEMAGNE, C. FABRY ET A. S. POSNER, *J. Physiol.* (Paris), 46 (1954) 325.
- <sup>4</sup> M. J. DALLEMAGNE, C. FABRY ET P. BODSON, *Experientia*, sous presse.
- <sup>5</sup> C. FABRY, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 401.
- <sup>6</sup> C. FABRY ET M. J. DALLEMAGNE, *Experientia*, 11 (1955) 19.
- <sup>7</sup> M. FALKENHEIM, E. E. UNDERWOOD ET H. C. HODGE, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 805.
- <sup>8</sup> S. GABRIEL, *Ztschr. Phys. Chem.*, 18 (1894) 257.
- <sup>9</sup> M. A. LOGAN ET H. L. TAYLOR, *J. Biol. Chem.*, 125 (1938) 391.
- <sup>10</sup> W. MINDER ET T. GORDONOFF, *Schweiz. med. Wochschr.*, 83 (1953) 35.
- <sup>11</sup> W. F. NEUMAN, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 705.
- <sup>12</sup> W. F. NEUMAN ET M. W. NEUMAN, *Chem. Reviews*, 53 (1953) 9.
- <sup>13</sup> W. F. NEUMAN ET J. H. WEIKEL, Preprinted abstracts: Conference on recent advances in the study of the structure, composition and growth of mineralized tissues. *The New York Academy of Sciences, section of Biology*; janv. 1954.
- <sup>14</sup> A. S. POSNER, C. FABRY ET M. J. DALLEMAGNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 304.
- <sup>15</sup> E. E. UNDERWOOD ET H. C. HODGE, *J. Dent. Research*, 31 (1952) 64.

Reçu le 28 avril 1955