

LA COMPOSITION DES SELS OSSEUX DANS LES TISSUS EN VOIE D'OSSIFICATION

I. INFLUENCE DES TRAITEMENTS DE MINÉRALISATION DE L'OS SUR LES PHOSPHATES DE CALCIUM SYNTHÉTIQUES*

CLAUDINE FABRY**

*Istituto di Chimica Generale e Inorganica, Università di Roma (Italie)
et Institut de Thérapie Expérimentale, Université de Liège (Belgique)*

(Reçu le 4 octobre 1958)

SUMMARY

The composition of bone salts in ossifying tissues

I. Influence of treatments of bone mineralization on synthetic calcium phosphates

Treatments of bone mineralization were applied to synthetic calcium phosphates which might be similar to the mineral present in ossifying tissues; variations in composition were always observed when the Ca/P is lower than 2.15. Thus, none of the existing methods for separating organic and inorganic fractions must be used for studying the bone salts early deposited in ossifying tissues.

INTRODUCTION

On ne connaît pas encore la composition et la structure du phosphate calcique qui précipite dans les tissus au début de l'ossification. On a pensé à un sel semblable à l'hydroxylapatite de synthèse, au phosphate tricalcique hydraté, à la brushite, voire même au pyrophosphate, et récemment on s'est demandé s'il ne pourrait pas s'agir de phosphate octocalcique.

Cette incertitude est due tout d'abord à ce que les déterminations chimiques et physiques de composition et de structure portent généralement sur des échantillons biologiquement grossiers. Dans ces conditions, le rapport Ca/P que l'on détermine est une valeur moyenne portant sur du matériel osseux à différents stades de calcification, auquel s'ajoute encore des fragments plus ou moins importants de tissus adjacents. La composition ainsi déterminée est de ce fait difficilement interprétable.

Mais il est une autre raison encore qui pourrait expliquer la divergence des résultats acquis sur la composition chimique des premiers sels osseux précipités. En supposant même que les déterminations soient faites sur des échantillons homogènes,

* Travail réalisé grâce à un subside de l' "International Federation of University Women".
** Chercheur agréé à l'Institut Interuniversitaire belge des Sciences Nucléaires.

c'est-à-dire sur le seul tissu osseux à un stade déterminé de calcification, elles se rapportent à un milieu complexe: les éléments dosés (calcium et phosphore) sont à la fois ceux qui constituent le sel minéral de l'os et ceux qui sont liés à la partie organique (protéines, mucopolysaccharides, esters phosphoriques, etc.). Or, la fraction organique, par exemple les esters phosphoriques, est particulièrement abondante dans l'os en formation. Il nous paraît par conséquent dangereux de sous-estimer a priori les erreurs qui pourraient en résulter dans la détermination de la composition de la phase minérale elle-même; il est donc indispensable, ne fût-ce qu'à titre de contrôle, de séparer le phosphate de calcium et la fraction organique.

Le problème que pose cette séparation n'est pas simple. En effet, toute méthode utilisée dans ce but, impliquant nécessairement un traitement chimique, est susceptible de modifier la nature des sels minéraux. Il faut en outre souligner qu'il existe des liaisons entre les fractions organique et inorganique de l'os^{8, 10, 12, 19}; leur séparation implique la rupture de ces liaisons, et par conséquent modifie vraisemblablement la répartition des ions minéraux (calcium et phosphore) entre les deux fractions.

Avant d'aborder l'étude de la composition des sels minéraux dans les tissus osseux en formation, et le problème que pose l'obtention d'échantillons homogènes, nous avons entrepris une étude préliminaire des méthodes de séparation des fractions organique et inorganique. Il en existe actuellement un certain nombre; les unes tendent à détruire la fraction minérale en modifiant le moins possible la fraction organique (décalcification à l'acide chlorhydrique dilué ou à l'EDTA); les autres au contraire tendent à isoler la fraction minérale par destruction de la partie organique ("minéralisation" par la glycérine alcaline, par l'éthylènediamine, par l'eau, par digestion enzymatique, par calcination). Notre but étant l'étude de la composition de la fraction minérale des tissus en voie de calcification, seules les secondes nous intéressent ici. Si elles laissent intacts, et dans une certaine mesure seulement, les sels minéraux de l'os adulte, il n'est pas du tout certain a priori qu'elles soient sans action sur les sels osseux primitifs, surtout si ceux-ci ont une composition chimique différente. Nous avons donc étudié l'influence des différentes méthodes de minéralisation actuellement connues, sur la composition chimique des phosphates de calcium préalablement préparés par synthèse, susceptibles de constituer le premier composé minéral de l'os.

TECHNIQUES GÉNÉRALES

Préparation des phosphates synthétiques

1. La brushite est préparée par mélange, en proportions stoechiométriques, d'une solution d'acide phosphorique et d'une solution de chaux fraîchement filtrée³.

2. Le pyrophosphate (forme a) provient du produit précédent, que l'on calcine pendant 1 h sur un bec Bunsen, dans un creuset en platine³.

3. Le phosphate tricalcique est obtenu par la méthode classique, rappelée récemment encore par DALLEMAGNE¹¹, c'est-à-dire par addition, à température ordinaire, d'une solution de chaux fraîchement filtrée à une solution d'acide phosphorique, jusqu'au virage de la phénolphtaléine.

4. L'"hydroxylapatite précipitée" de WALLAEYS (phosphate basique de rapport Ca/P 2.15) est préparée suivant la méthode donnée par cet auteur²⁰.

5. Le phosphate octocalcique est précipité de deux façons différentes.

a. Une première méthode est dérivée de celle que décrit ARNOLD²; elle consiste à

ajouter très rapidement, à température ordinaire, une solution diluée de chaux fraîchement filtrée à une solution d'acide phosphorique dans les proportions stoechiométriques convenables: 2 ml d'acide phosphorique sont étendus par 150 ml d'eau distillée; on y ajoute 190 ml d'une solution fraîche de chaux dont la concentration est préalablement déterminée (42 mequiv./l); on centrifuge immédiatement pendant 2 min à 4,000 rev./min; le précipité gélatinieux est alors essoré sur un filtre Büchner. On répète l'opération autant de fois qu'il faut pour obtenir un stock suffisant; on laisse sécher à température ordinaire.

Le produit obtenu donne un spectre de diffraction des rayons X extrêmement flou, où la bande caractéristique^{2,7} du phosphate octocalcique est de ce fait difficile à repérer*. Ce produit est donc formé de cristaux extrêmement petits, ce qui ne doit pas nous étonner puisque le précipité a été séparé de ses eaux-mères alors qu'il est à peine formé. Ce phosphate octocalcique ne contient pas de brushite, ainsi que nous l'avons contrôlé au microscope polarisant.

b. On peut également préparer le phosphate octocalcique par hydrolyse d'un phosphate acide. Cette méthode consiste à hydrolyser lentement, à 40°, du phosphate de calcium secondaire⁷ ou primaire, dans une solution d'acétate sodique 0.5 M, en renouvelant cette dernière chaque fois que le pH s'abaisse jusqu'aux environs de 6.1. Trois grammes de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck) sont maintenus en suspension, à 40°, dans 500 ml d'acétate sodique 0.5 M. Le pH est contrôlé avec du papier indicateur Merck (6.6-8.0); les 500 ml de liquide sont renouvelés dès que la solution s'acidifie, soit après 2 h, puis après 4 h, puis enfin après 48 h. Après 4 jours, on décante, puis on termine la séparation sur filtre. Le produit est lavé avec 200 ml d'une solution d'acétate sodique 0.05 M. On laisse sécher à température ordinaire.

La diffraction des rayons X donne un spectre dont les bandes sont très nettes, et qui présente la raie caractéristique du phosphate octocalcique.

Méthodes de dosages

Le calcium est dosé par précipitation sous forme d'oxalate calcique et titré au permanganate potassique. La précision est de $\pm 0.5\%$ étant donné les quantités habituellement dosées.

Le phosphore (orthophosphate) est dosé colorimétriquement suivant la méthode d'ALLEN¹. La précision est de $\pm 0.5\%$ pour les prises d'essai employées. Pour doser le pyrophosphate, on le transforme préalablement en orthophosphate: la prise d'essai est hydrolysée à 100° (bain-marie) par HCl N pendant 15 min. Nous avons contrôlé qu'après ce temps, la réaction est terminée; 30 min d'hydrolyse donnent les mêmes résultats.

Le rapport Ca/P est donc déterminé à $\pm 1\%$.

Le Tableau I donne l'analyse des produits dont nous avons réalisé la synthèse et qui ont servi à nos essais.

RÉSULTATS

Méthode de Gabriel

En 1894, GABRIEL¹⁵ a mis au point une méthode de destruction des matières

* Signalons d'ailleurs que les préparations de phosphate octocalcique décrites par ARNOLD ne donnent pas toutes cette raie caractéristique.

TABLEAU I
ANALYSE DES PRODUITS OBTENUS PAR VOIE SYNTHÉTIQUE

		<i>Ca P</i> Théorique	$\frac{\%}{\text{Ca}} \text{Ca}$ (± 0.15)	$\frac{\%}{\text{P}} \text{P}$ (± 0.1)	<i>Ca P</i> ($\pm 1\%$)
Pyrophosphate:	séché à 105°	1.204	31.7	23.0	1.325
Brushite:	séché à 105°	1.204	26.5	19.85	1.33
Phos. octocalcique prépar. I	séché à T.O.	1.725	32.4	18.8	1.72
	séché à 105°	1.725	34.4	19.15	1.80
	séché à 105° P. hydrolysé	1.725	34.4	19.7	1.745
prépar. II	séché à 105°	1.725	33.4	18.9	1.77
	séché à 105° P. hydrolysé	1.725	33.4	19.3	1.73
Phos. tricalcique:	séché à 105°	1.94	35.0	18.1	1.93
Phos. "WALLAEYS":	séché à 105°	2.155	37.1	17.15	2.16

organiques de l'os en le traitant par la glycérine alcaline; il a montré, par de nombreuses analyses, que la composition des sels de l'os adulte était la même avant et après ce traitement.

La technique expérimentale que nous avons adoptée est celle décrite par cet auteur; toutefois, nous avons alcalinisé la glycérine, non par 3 g de KOH/100 ml comme il l'indique, mais par 6 g/100 ml, comme le font la plupart des auteurs qui ont utilisé cette méthode après lui.

Dans un Erlenmeyer de 500 ml, on dissout 6 g de KOH p.a. dans 100 ml de glycérine bidistillée (p.a. Merck). On y ajoute 300 mg du phosphate à étudier, séché à l'étuve à 105° pendant un minimum de 24 h. On couvre l'Erlenmeyer avec un verre de montre et on fait bouillir la préparation, en évitant de chauffer trop brutalement. Nous avons fixé la durée de l'ébullition à 30 min, temps comparable à celui que nécessite généralement la minéralisation du matériel osseux réduit en poudre. On laisse alors refroidir et on élimine la glycérine par décantation. On ajoute ensuite 100 ml d'eau distillée bouillante, on agite pendant 3 ou 4 min, on laisse reposer et on élimine l'eau par décantation. On lave encore deux fois à l'eau bouillante; on continue alors les lavages (100 ml d'eau) à température ordinaire, jusqu'à disparition de toute trace d'alcalinité; 6 ou 7 lavages sont nécessaires pour obtenir ce résultat.

Le produit est alors amené sur filtre, abandonné un jour à température ordinaire, puis séché à l'étuve à 105° pendant au moins 24 h. On en dissout un poids connu dans de l'eau acidulée à l'acide chlorhydrique (60 mg, 1 ml HCl de densité 1.18, amenés à 100 ml). On détermine la teneur en calcium et en phosphore (ortho et pyrophosphates). Chaque expérience est faite en double.

Cette méthode comporte donc deux étapes, qui nous semblent chacune susceptibles d'influencer la composition des phosphates calciques: la minéralisation elle-même et le lavage à l'eau. On verra plus loin que ce dernier peut à lui seul entraîner des modifications dans la composition des phosphates étudiés. Il est cependant indispensable: RICHELLE ET DALLEMAGNE¹⁸ ont tout récemment encore insisté sur la nécessité d'opérer avec des sels osseux soigneusement lavés, si l'on veut obtenir une préparation qui puisse servir à des études chimiques rigoureuses.

Le Tableau II montre que le traitement par la glycérine alcaline, dans des conditions comparables à celles que nécessite la séparation de la fraction minérale des os, modifie la composition des phosphates de calcium synthétiques étudiés: le rapport

TABLEAU II

INFLUENCE DU TRAITEMENT DES PRODUITS SYNTHÉTIQUES PAR LA GLYCÉRINE ALCALINE

	a	<i>P dosé sans hydrolyse</i>			<i>P dosé après hydrolyse*</i>		
		Ca % (± 0.15)	P % (± 0.1)	Ca/P ($\pm 1\%$)	Ca % (± 0.15)	P % (± 0.1)	Ca/P ($\pm 1\%$)
Pyrophosphate:	a	34.1	17.0	2.00	34.1	18.1	1.88
	b	34.35	17.25	1.99	34.35	18.1	1.90
Brushite:	a	36.5	17.75	2.05	36.05	17.85	2.02
	b**	36.45	17.6	2.07			
Phos. octocalcique prépar. I:	a	37.0	17.55	2.09	35.8	17.2	2.08
	b	36.35	17.45	2.10			
prépar. II	a	36.5	17.4	2.10	36.1	17.4	2.08
	b	36.3	17.15	2.12	34.75	17.1	2.09
Phos. tricalcique:	a	35.85	17.0	2.105	35.25	17.0	2.075
	b	36.35	17.4	2.09			
Phos. "WALLAEYS":	a	36.8	17.15	2.15			
	b	37.05	17.3	2.14			

* Les dosages sont répétés sur d'autres solutions (excepté dans le cas du pyrophosphate): de faibles variations dans le degré d'hydratation des solides au moment de la pesée expliquent les légères différences dans les pourcentages de Ca.

** Echantillon très finement broyé.

Ca/P s'élève et tend à se rapprocher de la valeur des composés les plus basiques, composés qui restent stables à la suite de ce traitement, soit le phosphate synthétique de rapport Ca/P 2.15 et la substance minérale de l'os adulte (Ca/P \pm 2.26).

Cette transformation n'est cependant pas complète. On ne peut en attribuer la raison à une grosseur particulaire suffisante pour ralentir la réaction entre le solide et le milieu dans lequel il est en suspension: un échantillon de brushite broyé très soigneusement (expérience b) donne les mêmes résultats que le produit non broyé.

L'explication nous semble plutôt devoir être attribuée à une des deux causes suivantes:

a. Il semble bien que la stabilité d'un composé déterminé dépende essentiellement du pH du milieu dans lequel il se trouve¹⁴. Dans le cas qui nous occupe, moins les composés de départ contiennent de calcium (c'est-à-dire plus leur Ca/P est bas), plus leur transformation en composé plus basique libère d'ions acides; l'acidification du milieu freinerait ainsi la réaction, qui finirait par s'arrêter pour une composition d'équilibre. Cependant, la grande quantité de KOH mise en jeu par rapport au poids de phosphate traité, rend cette explication douteuse.

b. Le temps de réaction pourrait aussi en être le facteur déterminant, la transformation demandant d'autant plus de temps que le rapport Ca/P du produit initial est bas et qu'elle exige la libération d'une quantité plus importante d'ions phosphates.

Nous n'avons pas étudié cette question de façon plus approfondie, notre but étant uniquement de mettre en évidence les transformations des phosphates synthétiques soumis aux traitements de minéralisation de l'os, dans les conditions expérimentales usuelles où ces derniers sont appliqués.

Quoi qu'il en soit, dans l'un et l'autre cas, l'importance de la proportion relative solide-liquide est primordiale. Cette dernière sera mise en évidence dans l'étude du traitement par l'éthylènediamine; en effet, la récupération quantitative du solide

TABLEAU III
INFLUENCE DU TRAITEMENT DES PRODUITS SYNTHÉTIQUES PAR L'ÉTHYLÉNEDIAMINE

	Avant le traitement						Après le traitement					
	Produit			Produit			Produit			Produit		
	<i>Ca/total</i>	<i>Ca/total</i>	<i>Ca/total</i>	<i>P/total</i>	<i>P/total</i>	<i>P/total</i>	<i>Ca/total</i>	<i>Ca/total</i>	<i>Ca/total</i>	<i>P/total</i>	<i>P/total</i>	<i>P/total</i>
Pyrophosphate	a	303.2	96.05	72.5*	96.0	70.95*	0	0	0	2.2	0.8*	1.35*
	b	300.3	95.15	71.8*	96.0	69.85*	+	0.8	1	2.8	0.8*	1.37*
	c	155.6	49.3	37.2*	48.6	36.15*	—	1.4	1	2.8	0.8*	1.35*
Brushite	a	310.3	83.8	62.8	84.1	51.0*	+	0.3	0.8	18.8	1	1.65*
	b	303.5	80.4	60.3	79.6	43.35*	—	1	0.8	28.3	1	1.84
	c	175.5	46.5	34.85	46.4	43.35*	—	0.2	0.8	34.0	1	2.03
Phos. octocalcique prépar. II	a	301.6	100.7	50.95	89.8	44.0*	—	10.9	1	—	0.7*	2.03*
	b	301.3	100.6	58.15	56.9	100.2	49.45	—	0.4	1	1.5	2.04
Phos. tricalcique	a	307.1	107.4	55.6	107.0	52.1	—	0.4	1	7	1	2.06
	b	300.5	105.4	54.4	104.1	50.4	—	1	1	8	1	2.08
Phos. 'WALLACE'S'	a	301.5	111.85	51.75	114.45	52.9	+	2.2	1	+	2.2	1
	b	301.5	111.85	51.75	112.9	52.75	+	1	1	1	1	2.14

* Phosphore dosé après hydrolyse.
** Phosphore dosé après hydrolyse.

après le traitement à la glycérine alcaline, comme d'ailleurs les déterminations de calcium et de phosphore dans la glycérine, ne sont malheureusement pas praticables expérimentalement.

En conclusion, si la méthode de Gabriel permet de séparer les fractions organique et inorganique de l'os adulte sans modifier la composition chimique des sels minéraux, elle ne peut être utilisée pour la minéralisation des tissus osseux en voie de calcification si l'on veut en déterminer rigoureusement le rapport Ca/P, puisque, quel que soit le Ca/P du composé primitif, on obtiendra toujours après le traitement, un phosphate basique de rapport Ca/P voisin de celui de l'os adulte.

Ethylènediamine

LOSEE et ses collaborateurs^{16, 17} détruisent les matières organiques de l'os par action de l'éthylènediamine. Notre technique expérimentale est dérivée de celle qu'ils ont décrite; nous avons toutefois supprimé les trois extractions à l'eau bouillante, consécutives au traitement à l'éthylènediamine: ces extractions, indispensables pour des fragments osseux de grandes dimensions, destinés à être utilisés en chirurgie, nous paraissent en effet moins nécessaires si l'on traite de l'os réduit en poudre que l'on peut aisément laver à température ordinaire; ceci a l'avantage de réduire les modifications de composition éventuelles, que ce lavage peut entraîner.

On pèse exactement environ 300 mg du phosphate à étudier, séché à 105° pendant au moins 24 h. L'échantillon est placé dans le manchon d'un appareil de Soxhlet; on extrait par 75 ml d'hydrate d'éthylènediamine (Merck, p.a.) pendant 20 h. On retire alors le manchon et son contenu; on les lave abondamment à l'eau distillée, à température ordinaire, jusqu'à disparition de toute trace d'acidité; ceci demande en général 2 à 3 h. On dissout alors quantitativement le solide par de l'acide chlorhydrique (300 mg, 5 ml HCl de densité 1.18, amenés à 500 ml). On détermine la teneur en calcium et en phosphore (ortho- et pyrophosphate) de la solution obtenue.

Chaque expérience est faite en double; le Tableau III rassemble les résultats.

Nous avons d'autre part traité de l'os total *adulte* par la même technique (fémur de bovidé, dégraissé, réduit en poudre et séché à la température ordinaire). Les pourcentages en calcium et en phosphore et le rapport Ca/P obtenus après extraction à l'éthylènediamine sont comparés (Tableau IV) aux valeurs correspondantes, obtenus après dissolution du minéral par une solution normale d'acide chlorhydrique ou après calcination.

TABLEAU IV
INFLUENCE DU TRAITEMENT DE L'OS ADULTE PAR L'ÉTHYLÉNEDIAMINE

	Ca % (<i>t</i> : <i>m.J</i>)	P % (<i>t</i> : <i>m.J</i>)	Ca/P (<i>t</i> : <i>m.J</i>)
Après traitement à l'éthylènediamine	25.15	11.0	2.28
	25.25	11.15	2.26
	25.2	11.0	2.28
Après extraction par HCl N	25.0	11.15	2.24
	25.1	11.15	2.25
Après calcination	25.2	11.15	2.26
	25.0	11.05	2.26

Comme la méthode de GABRIEL, le traitement des phosphates synthétiques par l'éthylènediamine en modifie la composition, sauf lorsqu'il s'agit des composés les plus basiques, c'est-à-dire du phosphate de rapport Ca/P 2.15, ou des sels d'un os adulte. Le pyrophosphate fait toutefois exception.

Cette transformation en composés plus basiques se fait uniquement par une perte d'ions phosphates, puisqu'après le traitement, on retrouve dans le solide la totalité du calcium qu'il contenait. La diminution de la quantité de phosphore du solide, déterminée par différence entre le phosphore mis en jeu et le phosphore retrouvé, ne peut malheureusement pas être contrôlée par des déterminations dans la phase liquide après l'expérience : l'éthylènediamine inhibe complètement la formation du complexe phosphomolybdique, grâce auquel le phosphore est dosé colorimétriquement.

Pour un des phosphates étudiés (brushite), nous avons fait varier la quantité totale de sel traité, en laissant constant le volume d'éthylènediamine utilisé. Le solide après le traitement a un rapport Ca/P d'autant plus élevé que le poids initial est petit. Ceci montre bien que le stade où s'arrête la transformation dépend de la proportion relative solide-liquide.

En conclusion, l'éthylènediamine, comme la glycérine alcaline, ne modifie pas le rapport Ca/P de l'os adulte, mais ne peut permettre de séparer de la fraction organique, un phosphate calcique primitif de rapport Ca/P inférieur à 2.15.

Minéralisation par l'eau

Pour opérer la séparation entre les fractions organique et inorganique, certains auteurs traitent la substance osseuse à l'autoclave, ou simplement à l'eau bouillante, pendant 24 h; la plus grande partie de la substance organique, constituée de collagène, se dissout en se transformant en gélatine. Ce procédé de séparation n'est cependant pas parfait, puisque les sels obtenus contiennent encore une certaine quantité d'azote^{5,8,13}; de plus, BEULIEU *et al.*⁵, ont montré que l'os adulte, traité par l'eau bouillante pendant 24 h, perdait une quantité appréciable de calcium et de phosphore, et relativement plus de calcium que de phosphore ce qui a pour effet d'abaisser le rapport Ca/P.

On sait d'autre part¹¹ qu'aucun des phosphates de calcium synthétiques de rapport Ca/P inférieur à 2.15 n'est parfaitement stable en milieu aqueux. Ce traitement à l'eau ne peut donc convenir pour séparer d'un tissu osseux en voie de calcification, un phosphate de Ca/P relativement bas.

Digestion enzymatique

BELL *et al.*⁶ ont songé à détruire la substance organique par digestion enzymatique (trypsine à pH 8). Mais pour obtenir une minéralisation poussée, sinon totale, ils font précéder ce traitement par une ébullition de 24 h dans l'eau distillée; les inconvénients de cette méthode sont donc les mêmes que ceux de la précédente.

Il n'est d'ailleurs pas étonnant qu'une ébullition dans l'eau doive compléter l'action enzymatique, si l'on songe que ASCENZI ET BENEDETTI⁴ ont montré que seul le collagène de la substance fondamentale, et non celui des fibres, est attaqué par les enzymes.

Calcination

La calcination à une température suffisante détruit évidemment les matières organiques par combustion. Ce procédé ne permet cependant d'éliminer que des

composés volatils, de sorte que les ions minéraux primitivement liés à la fraction organique demeurent dans le résidu de calcination; la rapport Ca/P de ce résidu est donc le même que celui de l'os total.

D'autre part, à côté du phosphate calcique, le tissu osseux contient encore d'autres sels calciques (carbonate, citrate, lactate); or, ces sels sont susceptibles de se combiner à l'état sec et à hautes températures, avec les phosphates de calcium de rapport Ca/P relativement bas²⁰, de sorte que si le rapport Ca/P global reste inchangé on risque cependant d'obtenir des phosphates calciques différents de ceux qui étaient primitivement présents dans l'échantillon étudié.

DISCUSSION ET CONCLUSION

En conclusion, aucune des méthodes actuelles de séparation chimique des fractions organique et inorganique ne peut s'appliquer au cas où le phosphate primitif aurait un rapport Ca/P inférieur à 2.15.

Nous pensons d'ailleurs qu'il est difficile de trouver une telle méthode. En effet, tout traitement s'effectuant à un pH fortement acide mettra les ions minéraux en solution, y compris ceux qui sont fixés à la fraction organique; par contre, tout traitement s'effectuant à un pH alcalin transformera le phosphate primitif en composés plus basiques. Il resterait donc à trouver une substance qui détruire la matière organique à un pH neutre, ou, de façon plus précise, à un pH où les différents phosphates de calcium sont stables; il nous paraît à ce propos important de faire remarquer que la glycérine alcaline ou l'éthylènediamine nous semble avoir bien moins une action spécifique, qu'agir simplement par leur alcalinité. Il resterait la possibilité d'une destruction enzymatique en milieu convenablement tamponné, mais nous avons rappelé que le collagène des fibres, sinon celui de la substance fondamentale, résiste à toute action enzymatique.

On peut aussi songer à identifier les phosphates osseux par certaines de leurs propriétés physiques; la détermination de leur composition rejoint ainsi le problème de leur structure. Ici également, il est important de ne pas perdre de vue que tout traitement préliminaire du matériel osseux risque d'en altérer les propriétés. Ces études physiques devraient donc porter sur de l'os total, intact, ce qui limite malheureusement les possibilités d'un certain nombre de techniques, par exemple celle de la diffraction des rayons X⁵.

L'étude de la composition et de la structure des tissus en voie d'ossification nous paraît donc impliquer des recherches portant simultanément sur leurs fractions organique et inorganique, et sur les relations qui existent entre elles.

RÉSUMÉ

Nous avons étudié l'influence des traitements de minéralisation de l'os sur la composition des divers phosphates de calcium, préalablement préparés par synthèse, et qui sont susceptibles de constituer le premier composé minéral des tissus en voie d'ossification. Aucune des méthodes actuellement connues de séparation des fractions organique et inorganique ne laisseraient cette dernière intacte, au cas où le phosphate primitif aurait un rapport Ca/P inférieur à 2.15.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. J. L. ALLEN, *Biochem. J.*, 34 (1940) 858.
- 2 P. W. ARNOLD, *Trans. Faraday Soc.*, 46 (1950) 1061.
- 3 A. ARTUR, *Ann. Chim.*, 16 (1955) 968.
- 4 A. ASCENZI ET E. L. BENEDETTI, *Arch. sci. biol. (Italy)*, 38 (1954) 234.
- 5 M. M. BEAULIEU, H. BRASSEUR, M. J. DALLEMAGNE ET J. NELON, *Arch. Intern. Physiol.*, 57 (1950) 411.
- 6 G. H. BELL, J. W. CHAMBERS ET I. M. DAWSON, *J. Physiol. (London)*, 106 (1947) 286.
- 7 W. BROWN, J. LEHR, J. SMITH ET A. W. FRAZIER, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 5318.
- 8 V. CAGLIOTTI, *Att. Vinc. Congr. Chimica pura e applicata*, 1935, p. 320.
- 9 V. CAGLIOTTI, A. ASCENZI ET M. SCROCCO, *Experientia*, 10 (1954) 371.
- 10 V. CAGLIOTTI, A. ASCENZI ET M. SCROCCO, *Arch. sci. biol. (Italy)*, 39 (1955) 116.
- 11 M. J. DALLEMAGNE, *J. physiol. (Paris)*, 43 (1951) 425.
- 12 D. D. DZIEWIATKOWSKI, *Trans. Conf. on Metabolic Interrelations*, J. Macy Ed., 4 (1952) 74.
- 13 J. E. EASTOE ET B. EASTOE, *Biochem. J.*, 57 (1954) 453.
- 14 C. FABRY, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 1325.
- 15 S. GABRIEL, *Z. physiol. Chem.*, 18 (1894) 257.
- 16 F. D. LOSEE ET L. A. HURLEY, *Nav. Med. Research Inst.*, 14 (1956) 911.
- 17 B. S. PECKHAM ET F. D. LOSEE, *J. Dental Research*, 34 (1955) 719.
- 18 L. RICHELLE ET M. J. DALLEMAGNE, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 1133.
- 19 P. S. RUBIN ET J. E. HOWARD, *Trans. Conf. on Metabolic Interrelations*, J. Macy Ed., 2 (1950) 155.
- 20 R. WALLAEYS, *Ann. Chim.*, 7 (1952) 808.

EXPERIMENTS ON ELECTROPHORESIS IN SEGMENTAL SYSTEMS COMPOSED OF POLYURETHANE FOAM

HAROLD M. DAVIDSON*

*The Cancer Research and Cancer Control Unit, Tufts University School of Medicine and
the Department of Cancer Research, New England Center Hospital, Boston, Mass. (U.S.A.)*

(Received September 8th, 1958)

SUMMARY

The use of foamed polyurethane sponge as a supporting medium in electrophoresis has been investigated. Segments of sponge were cut to fill horizontal and vertical cells which are described. The use of the described apparatus is recommended because of the ease of recovery of a product free from contamination and because of the latitude afforded in investigating migration through heterogeneous pathways. Thus, these cells were used in studies on zone electrophoresis and isoelectric migration employing serum, albumin and preparations of human prostatic acid phosphatase. The applicability of the segmental sponge system to electrophoretic studies requiring either one or simultaneously several gradients such as density, pH and/or ionic strength has been demonstrated.

INTRODUCTION

Preliminary efforts to isolate human prostatic acid phosphatase by electrophoresis with starch gel as the supporting medium gave a product heavily contaminated with

* Present address: 1677 Beacon Street, Brookline 46, Mass., U.S.A.