

La phosphatase des os et le mécanisme général de l'ossification¹

Par JEAN ROCHE, Marseille²

La formation et la calcification des os sont des phénomènes complexes, dont l'étude histologique, physiologique et biochimique a permis de dissocier les divers aspects. On peut, d'un point de vue très général, distinguer trois processus fondamentaux dans l'ossification, à savoir: la synthèse d'un support protéique apte à se calcifier, l'apparition à son niveau de phosphates de calcium insolubles et la fixation de ceux-ci aux protéines osseuses. Chacun d'eux est dans une certaine mesure indépendant des autres et, par ailleurs, spécifique du système osseux, dont les organes sont physiologiquement les seuls à en être le siège. Le mécanisme biochimique de la formation du «sel de l'os» a été particulièrement étudié au cours des vingt dernières années et l'on peut coordonner les résultats obtenus dans ce domaine pour en tirer une conclusion générale. Le but de mon exposé est défini dans cette proposition.

1^o Le mécanisme physiologique de la calcification et la phosphatase des os

La formation de phosphates de calcium insolubles dans les os exige la mise en œuvre d'un mécanisme physiologique particulier, en dehors duquel elle n'est possible qu'avec une très faible intensité³. En effet, les humeurs dérivées du plasma sanguin renferment en moyenne, par 100 cm³, de 3 à 5 mg de phosphore minéral (phosphates) et de 8 à 10 mg de calcium, dont une partie seulement (environ 90 pour 100 des phosphates et au plus 50 pour 100 du calcium) est ionisée (BRULL). Par ailleurs, la vitesse de la circulation est des plus réduites dans les territoires osseux en voie de calcification, ce qui limite l'apport sanguin direct en éléments minéraux. Néanmoins, la formation du «sel de l'os» s'opère parfois avec une singulière rapidité, dont la «prise» des cals de fracture, signalée par les chirur-

¹ Conférence faite le 28 mai 1946 au Hallerianum de l'Université de Berne.

² Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marseille.

³ On ne discutera pas ici la nature du «sel de l'os». Celui-ci a été longtemps considéré comme formé de carbonato-apatite, $3(\text{PO}_4)_2\text{Ca} \cdot \text{CO}_3\text{Ca}$, en se basant sur les résultats de l'analyse chimique et sur le spectre de diffraction des rayons X particulier à la substance osseuse. Les récents travaux de DALLEMAGNE et MELON montrent que le phosphate tricalcique α isomorphe des apatites, $3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3 \cdot \text{H}_2(\text{OH})_2$, est le principal constituant des os. On trouvera un exposé d'ensemble des travaux récents consacrés à ce problème dans: M. J. DALLEMAGNE, Données récentes sur la nature et sur le métabolisme de l'os, Actual. biochim. (belge), fasc. 2, 1 vol., 68 p., 1945, Desoer éd., Liège, et Masson éd., Paris.

giens et facile à contrôler expérimentalement, est l'exemple le plus remarquable. Il apparaît dès lors que la calcification osseuse ne peut pas avoir lieu seulement aux dépens d'un prélèvement direct d'ions $\text{PO}_4^{=}$ et Ca^{++} dans les humeurs, comme on l'a longtemps admis. Les travaux sur la phosphatase des os inaugurés par ROBISON¹ ont ouvert dans ce domaine une voie nouvelle de recherche à partir de l'hypothèse suivante.

«Au cours de mes travaux sur l'acide hexosemono-phosphorique isolé des produits de la fermentation (alcoolique), j'ai étudié l'hydrolyse enzymatique de cet ester. Dans certaines expériences où ses sels solubles de calcium ou de baryum ont été employés comme substrat, l'évolution de l'hydrolyse se manifestait par la formation d'un précipité de phosphates de calcium ou de baryum peu solubles: $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6\text{PO}_4\text{Ca} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{PO}_4\text{CaH}$. La formation de ce précipité m'a donné l'idée de rechercher si une réaction du même ordre pouvait prendre part au dépôt du phosphate de calcium au cours de l'ostéogénèse².»

La question posée reçut aussitôt une première réponse par la découverte de la phosphatase des os, dans laquelle ROBISON distingua immédiatement un élément primordial du mécanisme de l'ossification, grâce à ses premiers travaux sur la calcification *in vitro* de coupes d'os immergées dans des solutions d'hexosemono-phosphates de calcium. Un ensemble de recherches a montré par la suite que la réalisation dans les os de conditions particulières permet seule à la phosphatase d'y remplir sa fonction. Il m'a paru utile d'en dégager la signification et de les résumer, car elles présentent un intérêt en ce qui concerne non seulement la chimie de l'ossification, mais aussi celle des phosphatas³, enzymes qui, selon leur localisation, et par là même selon les conditions de leur action, assument des rôles très divers, dont les plus remarquables sont: le contrôle de la calcification dans les os, celui de la sécrétion des phosphates dans le rein et celui de la phosphorylation de glucides, de lipides et de vitamines dans la muqueuse intestinale. Cette simple énumération permet de saisir dans quelle étroite mesure il convient de lier l'étude biochimique de la phosphatase du squelette à celle de son mode d'action pour comprendre son rôle.

¹ R. ROBISON, Biochem. J. 17, 286 (1923).

² Loc. cit., p. 287.

³ On trouvera un exposé d'ensemble sur la biochimie de ces enzymes dans: J. ROCHE et J. COURTOIS, Exp. ann. biochim. méd. 4, 221-284 (1943), et dans J. ROCHE, Helv. chim. acta 29, 1253-1267 (1946).

A) Existence et caractères de la phosphatase des os.

On désigne sous le nom de phosphatase tout enzyme dont l'activité libère de l'acide orthophosphorique à partir des substrats les plus divers (mono- et diesters orthophosphoriques, pyrophosphates, phosphoamides, anhydrides organiques de l'acide orthophosphoriques, métaphosphates) et catalyse la formation de ceux-ci. Des phosphatases spécifiques de chaque type de substrat ont été séparées, certaines sous un état de pureté très élevé et l'une d'elles a été obtenue à l'état cristallisé¹. On a pu les classer (MUNEMURA; FOLLEY et KAY; ROCHE et COURTOIS) en se basant principalement sur leur p_H optimum d'action, leur sensibilité aux effecteurs et leur stabilité dans divers milieux.

Les os et les dents des Vertébrés en croissance renferment une phosphomonoestérase, le «bone enzyme» de ROBISON, accompagnée d'une petite quantité de pyrophosphatase, la première seule jouant un rôle direct dans la calcification. Cette phosphomonoestérase, souvent désignée sous le nom de phosphatase des os, est très probablement sécrétée par les ostéoblastes. Elle est facilement extraite par macération aqueuse des organes broyés et peut alors être séparée de diverses impuretés protéiques par des précipitations successives à l'alcool (1 volume) additionné d'éther (3 volumes)², mais elle n'a pas été jusqu'ici obtenue à l'état pur. C'est une phosphomonoestérase alcaline, du type I de la classification de ROCHE et COURTOIS, comme celles dont l'action prédomine dans le rein, la muqueuse intestinale et de nombreux tissus animaux moins riches en enzyme que ces derniers. Elle hydrolyse de multiples esters naturels (acides hexosemono- et -diphosphoriques, glycérophosphoriques, mono- et diphosphoglycériques entre autres) ou synthétiques (acides méthyl-, éthyl-, phényl-, crésylphosphoriques) à un p_H optimum compris entre 8,5 et 9,4 selon le substrat. Son action sur les esters naturels dérivés des glucides présente un p_H optimum de 9,2.

Notablement plus active sur le β - que sur l' α -glycérophosphate de sodium, son efficacité augmente en présence de sels ionisables de magnésium (ERDTMANN). Lorsque l'on enrichit progressivement une solution de phosphatase alcaline en ions Mg⁺⁺ par addition de quantités croissantes de sulfate ou de chlorure de magnésium, l'activité de l'enzyme augmente jusqu'à un maximum au delà duquel elle s'abaisse, Mg⁺⁺ devenant même inhibiteur à des taux très élevés. Il existe donc une concentration optima en cet ion (JENNER et KAY³), en général voisine de M/500—M/1000 dans les macérations osseuses. Les effets de Mg⁺⁺, qui ne sau-

raient manquer de s'exercer physiologiquement, sont influencés par divers facteurs cellulaires (état de combinaison de l'enzyme, composition du milieu, présence d'autres effecteurs). D'une part la fraction soluble de la phosphatase (lyoenzyme) est plus sensible à Mg⁺⁺ que la fraction combinée aux protéines cellulaires (desmoenzyme). D'autre part les os des animaux en fin de croissance renferment une phosphatase que les sels de magnésium activent comparativement beaucoup moins que celle des sujets en période de croissance active¹. L'étude de la purification des phosphatases a montré que leur sensibilité aux effecteurs métalliques est d'autant plus grande que leur purification est plus avancée². Il est donc certain que l'intensité de l'action de Mg⁺⁺ est fonction non seulement de sa concentration, mais aussi de multiples facteurs tissulaires.

Parmi les autres effecteurs susceptibles de jouer un rôle physiologique, il convient de retenir surtout les thiols, les acides aminés et les ions phosphoriques. La cystéine et les thiols sont activateurs à de très faibles taux (M/10000 au plus) et se comportent alors comme des antiinhibiteurs (formation de complexes avec des métaux lourds naturels inhibiteurs); ils gênent fortement l'activité enzymatique à des taux plus élevés³. Les acides aminés, activateurs énergiques des phosphatases alcalines purifiées⁴, n'exercent qu'un effet minime sur l'enzyme brut. Quant aux phosphates, produits de l'hydrolyse même du substrat, leur action inhibitrice sur toutes les phosphatases est considérable et se manifeste à des taux voisins de la phosphatasémie⁵. Ces faits montrent, combien la mise en jeu de divers effecteurs dans la substance osseuse est importante pour régler le pouvoir phosphatasique d'un territoire en voie de calcification.

B) Répartition dans la nature et localisation de la phosphatase des os.

Un premier fait a orienté l'attention des biochimistes cherchant à préciser le rôle de la phosphatase dans l'ossification: seules les pièces squelettiques en voie de formation ou de croissance sont riches en enzyme; les os des animaux adultes en sont pratiquement dépourvus. Le cartilage de conjugaison des os longs, par lequel s'opère l'allongement de ceux-ci, renferme de la phosphatase en quantité beaucoup plus grande que les épiphyses et les diaphyses chez le Rat en croissance et le cartilage articulaire en est dépourvu⁶. Dans le cartilage de conjugaison lui-même, les seules régions douées d'activité enzymatique sont celles qui sont par ailleurs ossifiables, à savoir: le cartilage d'accroissement proprement dit et la mét-

¹ J. ROCHE, A. FILIPPI et A. LEANDRI, Bull. Soc. Chim. biol. 19, 1314 (1937).

² NGUYEN - VAN THOAI, C. r. Soc. Biol. 139, 814 (1945).

³ F. DEL REGNO, Arch. Sci. biol. 24, 532 (1939).

⁴ J. ROCHE, NGUYEN - VAN THOAI, Bull. Soc. Chim. biol. (Trav.) 26, 1047 (1944).

⁵ M. MARTLAND et R. ROBISON, Biochem. J. 21, 665 (1927).

⁶ M. MARTLAND et R. ROBISON, Biochem. J. 18, 1152 (1924).

¹ NGUYEN - VAN THOAI, J. ROCHE et L. SARTORI, C. r. Soc. Biol. 138, 47 (1944).

² R. ROBISON a résumé ses travaux sur la préparation et les caractères biochimiques de la phosphatase des os dans: Ergeb. d. Enzymforsch. 1, 280—294 (1932), et dans: E. BAMANN et K. MYR-BÄCK, Methoden der Fermentforschung 2, 1655—1662 (1941).

³ H. D. JENNER et H. D. KAY, J. biol. Chem. 93, 733 (1931).

physse; le cartilage sérié, à petites cellules, aux dépens duquel se forment les assises sous-jacentes n'en présente aucune^{1,2}.

L'étude histochimique de la localisation de l'enzyme dans les os et les dents des embryons des Mammifères a apporté des documents du même ordre. C'est ainsi que, pour GOMORI tous les cartilages des pièces squelettiques embryonnaires destinés à s'osser renferment de la phosphatase, alors que les autres régions cartilagineuses en sont dépourvues.

Des observations relevant de la biochimie comparée ont utilement complété les précédentes. La répartition de la phosphatase dans les os et les dents de divers poissons présente un parallélisme étroit avec leur calcification. Chez les Téléostéens (poissons osseux), les os, les dents et les écailles renferment l'enzyme, tandis que, chez les Sélaciens (poissons cartilagineux) on ne le rencontre que dans les plaques calcifiées présentes à la surface de certains os cartilagineux et non dans la masse de ceux-ci³. Les dents calcifiées des Sélaciens sont riches en phosphatase et il en est de même de leurs os dermiques (boucles des Raies par exemple); par contre, les dents cornées des Cyclostomes en sont dépourvues⁴. A l'échelle anatomique comme à l'échelle histologique, la présence de l'enzyme paraît donc liée à la calcification des os et des dents.

La même indication peut être tirée d'observations d'ordre expérimental sur la formation d'os hétérotopique. L'implantation de fragments de vessie dans la paroi abdominale du Chien ou du Lapin donne en général naissance à du tissu ostéoïde aux dépens du greffon. Or, seuls les fragments vésicaux subissant cette transformation s'enrichissent en enzyme⁵. De même, l'ossification expérimentale *in situ* du cartilage auriculaire du Lapin consécutive à l'injection à son niveau de sang et d'extraits osseux⁶ va de pair avec l'apparition d'une activité phosphoestérasique.

C. Variations de l'activité phosphatasique en fonction de la croissance osseuse. Toutes les données établies dans ce domaine traduisent un certain parallélisme entre l'intensité des processus calcifiants et celle de l'activité phosphatasique. Dès 1924, MARTLAND et ROBISON ont constaté que la rotule humaine ne renferme d'enzyme qu'au delà de la quatrième année de vie au moins, âge auquel apparaissent en général les premiers points d'ossification dans cette pièce squelettique. Par la suite une remarquable série de travaux pour-

suivie par l'école anglaise¹ et récemment complétés par l'école américaine² a montré que les os embryonnaires, presque dépourvus d'enzyme au début de leur formation, s'enrichissent progressivement en phosphatase au cours de leur développement *in vitro* ou dans l'organisme du Lapin, du Rat, du Poulet. L'activité des ostéoblastes en tant que cellules sécrétant l'enzyme est à cet égard prédominante; elle précède de peu dans le temps la formation des points d'ossification. Les recherches histochimiques de GOMORI, de MOOG, d'ENGEL et FURUTA poursuivies par la suite sur les os et les dents embryonnaires ont étendu et corroboré ces résultats; de même l'étude de l'activité phosphatasique des sarcomes osseux entreprise par WOODARD et KENNEY.

L'étude quantitative du pouvoir phosphatasique des pièces squelettiques embryonnaires au cours de leur croissance *in vitro* (FELL et ROBISON) illustre la simultanéité de leur augmentation de poids — donc grossièrement de leur calcification — et de leur teneur en enzyme. Un ensemble d'observations faites par mes collaborateurs et dans lesquelles l'activité des organes a été rapportée non à leur poids total, mais à celle de leur stroma protéique est encore plus démonstratif. Les os longs du Rat sont, à la naissance, doués d'une activité phosphatasique élevée, qu'ils conservent tant que le développement des animaux demeure très rapide (jusque vers 40 grammes de poids corporel), après quoi ils s'appauvrisent peu à peu en enzyme, dont les os des animaux adultes sont très pauvres (ROCHE, FILIPPI et LEANDRI). Un petit nombre de données déterminées chez l'Homme traduit le même phénomène³.

Les résultats d'une expérimentation se réalisant naturellement au cours de la vie des poissons sont également significatifs. Comme tous les Téléostéens, la Sardine méditerranéenne (*Clupea pilchardus* Walb.) présente alternativement une période de croissance, occupant le printemps et le début de l'été, et une période, dite de repos, couvrant les autres saisons et au cours de laquelle tout développement cesse. L'activité phosphatasique des os de ce poisson augmente pendant la première et diminue pendant la seconde. Ses variations sont particulièrement manifestes dans les écailles, os membranous de structure très simple et dont la croissance périodique est indiquée par l'existence des «anneaux d'été» et des «anneaux d'hiver», mise à profit par les ichtyologues pour déterminer l'âge des poissons. Comme le montre l'examen de la figure 1, les écailles sont très pauvres en phosphatase pendant la saison froide; leur teneur en enzyme devient, par

¹ M. MARTLAND et R. ROBISON, Biochem. J. 18, 1152 (1924).

² A. POLICARD, M. PÉHU, J. ROCHE et BOUCAUMONT, Bull. Histol. appl. 8, 171 (1931).

³ S. BODANSKY, R. M. BAKWIN et H. BAKWIN, J. biol. Chem. 94, 551 (1931) et J. ROCHE et E. BULLINGER, Bull. Soc. Chim. biol. 21, 166 (1939).

⁴ J. ROCHE, E. BULLINGER et J. COLLET, Enzymologie 7, 273 (1939) et J. ROCHE, J. COLLET et M. MOURGUE, Enzymologie 8, 257 (1940).

⁵ C. B. HUGGINS, Biochem. J. 25, 728 (1931).

⁶ R. SEVERI, Sperim. 91, 478 (1937).

¹ H. B. FELL et R. ROBISON, Biochem. J. 23, 767 (1929) et 24, 1905 (1930); R. ROBISON et H. B. FELL, ibid. 28, 2243 (1934); R. ROBISON et G. F. S. NIVEN, ibid. 28, 2337 (1934); G. BOURNE, Quart. J. exper. Physiol. 10, 319 (1943).

² G. E. GLOCK, J. Physiol. 98, 1 (1940); N. H. HOROWITZ, J. dent. Res. 21, 519 (1942); F. MOOG, Biol. Bull. 86, 51 (1944).

³ G. MONTEMARTINI, Policlin. (Sez. chirurg.) 44, 1 (1937).

contre, intense à l'approche du printemps, lors de la poussée de croissance, et s'abaisse au cours des mois d'été, quand cette dernière se ralentit¹.

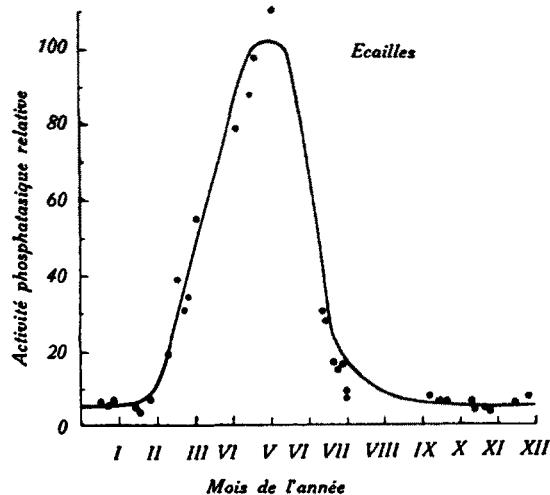


Fig. 1. Activité phosphatasique relative des écailles chez la Sardine méditerranéenne au cours des deuxièmes et troisièmes années de vie. Abscisses: mois de l'année. Ordonnées: activité phosphatasique relative. (D'après ROCHE et COLLET.)

Les dents des Sélaciens, en particulier du Requin peau bleue (*Carcharias glaucus* L.), se prêtent aussi à des observations suggestives. Il existe chez ces animaux plusieurs rangées concentriques de dents, dont les plus profondes, en croissance continue, remplacent les plus externes au fur et à mesure de leur chute. De ce fait, on trouve implantées sur la peau des mandibules du squale des dents à des degrés divers de développement, depuis un stade antérieur à toute calcification jusqu'à la fin de celle-ci. Il en découle que l'on peut étudier sur un même sujet l'évolution des divers processus participant à la formation des dents. Or, l'expérience a montré que, si l'activité phosphatasique des dents est très minime lorsque leur calcification est complète, elle est antérieurement d'autant plus forte que celle-ci est moins avancée (teneur en P total: 0,5 à 0,9 pour 100 du poids frais des dents du sixième rang et 14,9 à 16,0 P pour 100 dans celles du premier rang). Il en découle une notion nouvelle, à savoir: que l'enzyme intervient physiologiquement surtout dans les étapes initiales de la calcification et manifeste une activité très grande, même avant le début de celle-ci².

La même conclusion ressort de l'étude des cals de fracture expérimentale. En effet, chez le Cobaye à radius droit fracturé, le cal demeure très pauvre en enzyme pendant la formation de sa matrice conjonctive (12 à 15 jours), puis s'enrichit rapidement en phosphatase dans la période qui précède immédiatement la «prise» (vers le vingtième jour) et devient presque

inactif après celle-ci (voir figure 4, p. 333)¹. Tous ces faits concordent donc pour suggérer l'hypothèse que la phosphatase joue un rôle important non seulement dans la calcification osseuse, mais aussi dans une période préliminaire, préparatoire, où le support protéique des sels de l'os s'organise en vue de la fixation ultérieure de ceux-ci. Aussi convient-il de se demander quel est le mécanisme d'action de l'enzyme des os.

D) Mécanisme d'action de la phosphatase des os. C'est à l'étude de la calcification *in vitro* de coupes d'os que les biochimistes se sont adressé pour résoudre le problème que leur posait la chimie physiologique. Les recherches de SHIPLEY², de SHIPLEY, HOWLAND et KRAMER³, de SHELLING, KRAMER et ORENT⁴ ont à cet égard servi de point de départ. Elles ont montré que la calcification de coupes d'os (région juxta-épiphysaire de tibias et de fémurs de jeunes rats rachitiques⁵) sont *in vitro* le siège de la formation d'un dépôt de phosphates de calcium quand on les immerge dans des solutions renfermant des ions PO_4^{3-} et Ca^{++} à des taux tels que le produit: mg P minéral par 100 cm³ \times mg Ca par 100 cm³, est égal ou supérieur à 40 (environ). ROBISON et ses collaborateurs, MACLEOD, ROSENHEIM, SOAMES en particulier, ont mis à profit ces observations pour rechercher dans quelle mesure des esters hydrolysables par la phosphatase peuvent remplacer les sels minéraux⁶. En présence de glycéro-phosphates ou d'hexosephosphates et d'ions calcium, la calcification des coupes a lieu plus intensément qu'à partir d'ions PO_4^{3-} et Ca^{++} pour des valeurs identiques du produit: P \times Ca et, dans le premier cas, elle se manifeste même lorsque celles-ci sont très notablement inférieures à 40. Cette observation est fondamentale, car elle démontre que la formation *in situ* d'ions phosphoriques sous l'action de l'enzyme des os favorise la calcification. On trouvera dans la figure 2 des microphotographies illustrant la formation d'un dépôt phosphocalcique dans le cartilage de conjugaison (ligne d'ossification) d'un tibia de Rat à partir d'hexosemono-phosphate de calcium (ester de ROBISON). L'imprégnation argentique (méthode de KOSSA) des régions calcifiées fait apparaître celui-ci en noir sur les clichés ci-dessous.

¹ J. ROCHE et M. MOURGUE, Bull. Soc. Chim. biol. (Trav.) 23, 1149 (1941); J. ROCHE et R. MARTIN-POGGI, ibid. 23, 1543 (1941).

² P. G. SHIPLEY, Bull. John Hopkins Hosp. 35, 304 (1924).

³ P. G. SHIPLEY, B. KRAMER et J. HOWLAND, Biochem. J. 20, 379 (1926).

⁴ D. SHELLING, B. KRAMER et R. ORENT, J. biol. Chem. 77, 569 (1928).

⁵ On a employé systématiquement pour ces expériences des coupes d'os de jeunes rats rachitiques pour des raisons de commodité. En effet, le cartilage de conjugaison de ces animaux est beaucoup plus large que celui des sujets normaux et, de ce fait permet de beaucoup mieux observer le dépôt de sels phosphocalciques à sa surface. On verra plus bas que ROCHE et DELTOUR ont substitué à ce matériel des coupes d'os embryonnaires normaux (MOUTON).

⁶ R. ROBISON, Biochem. J. 17, 286 (1923); R. ROBISON et H. A. ROSENHEIM, ibid. 28, 684 (1934). — R. ROBISON, H. A. ROSENHEIM et M. MACLEOD, ibid. 24, 1927 (1930); R. ROBISON et K. M. SOAMES, ibid. 18, 740 (1924) et 24, 1922 (1930).

¹ J. ROCHE et J. COLLET, Bull. Soc. Chim. biol. 22, 245 (1940).

² J. ROCHE et E. BULLINGER, Bull. Soc. Chim. biol. 21, 166 (1939).

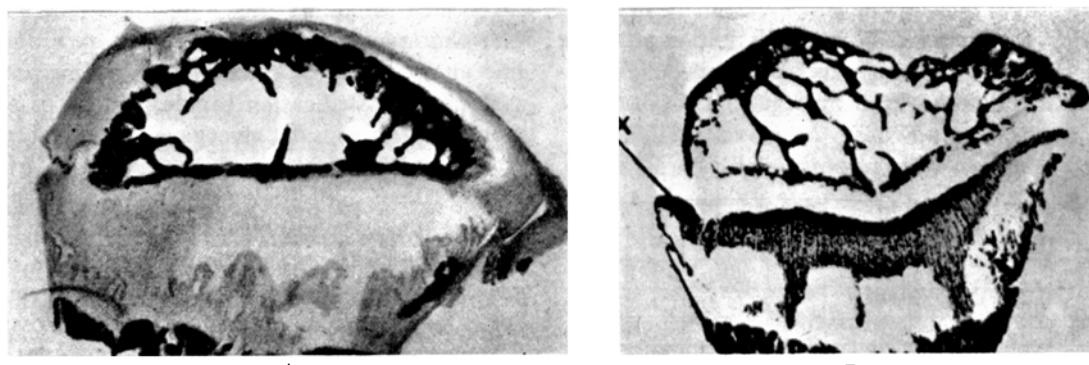


Fig. 2. Coupes d'épiphyse supérieure d'un tibia de jeune Rat rachitique imprégnées au nitrate d'argent (méthode de Kossa): A absence de calcification du cartilage de conjugaison dans la coupe témoin (zone claire); B présence d'un dépôt de phosphates (marqué X) dans le cartilage de conjugaison après séjour de 18 heures dans une solution nutritive renfermant de l'hexosemonophosphate de calcium (ester de ROBISON), 0,1 M (région noire dans la zone claire). (D'après ROBISON.)

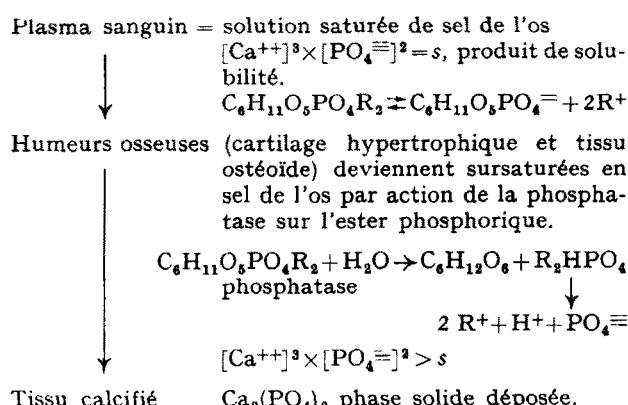
ROBISON et ses élèves ont cherché à étendre la portée physiologique de ce fait en étudiant l'influence de divers facteurs chimiques sur la fixation des phosphates par les os et établi que de faibles taux, de bicarbonates alcalins la favorisent, tandis que les protéines sériques la gênent. Toutefois, le caractère histochimique de leurs observations ne permet pas d'en tirer des conclusions très précises et, par ailleurs, la méthode de Kossa met en évidence des radicaux phosphoriques et non des combinaisons phosphocalciques. Ces réserves ne diminuent en rien l'intérêt des travaux de ROBISON et de ses élèves, travaux dont l'interprétation générale a permis de dégager des faits l'hypothèse suivante pour expliquer le mode d'action de la phosphatase dans l'ossification. «Le sang doit être considéré comme étant normalement une solution saturée de sel de l'os que, pour simplifier la discussion, nous admettons être du phosphate tricalcique. Il renferme, en dehors de phosphates minéraux, un ester phosphorique dont le sel de calcium est soluble¹. Cet ester ne donne pas naissance à des ions $\text{PO}_4^{=}$ en se dissociant et sa présence n'intervient pas dans la saturation du sang en phosphate tricalcique. Les tissus qui se calcifient, à savoir le cartilage hypertrophique et le tissu ostéoïde, renferment un enzyme, une phosphatase, qui hydrolyse cet ester en libérant des phosphates minéraux. Cette réaction augmente la concentration en ions $\text{PO}_4^{=}$ et le produit des concentrations de $\text{PO}_4^{=}$ et de Ca^{++} dépasse alors le produit de solubilité du phosphate tricalcique, lequel se dépose dans la substance organique fondamentale du tissu osseux (loc. cit. p. 56)².» Cette conception est objectivée par le schéma ci-dessous³:

¹ Le plasma sanguin renferme chez les Vertébrés supérieurs des quantités d'esters phosphoriques hydrolysables par les phosphatas contenant au maximum 0,5 mg P par 100 cm³.

² R. ROBISON, The significance of phosphoric esters in metabolism, 1 vol., 104 p., New-York University press ed. (1932).

³ La remarque suivante figure au bas de ce schéma dans le texte original: «Pour simplifier l'exposé, on a considéré le sel de l'os comme étant le phosphate tricalcique et l'ester un hexosemonophosphate. Ce schéma s'applique également, si le sel de l'os est un produit plus complexe, comme la carbonatoapatite, et si l'hexosemonophosphate est remplacé par tout autre ester phosphorique hydrolysable par la phosphatase.»

Schéma de la calcification (ROBISON)



L'étude qualitative de la calcification *in vitro* de coupes d'os a permis la première interprétation précise du rôle de la phosphatase. Elle devait nécessairement être complétée par des recherches quantitatives dont on pouvait attendre des conclusions plus précises. J'ai poursuivi cette étude avec DELTOUR¹ sur des coupes du cartilage d'accroissement (zone active du cartilage de conjugaison) et de l'os métaphysaire sous-jacent provenant de fémurs et de tibias d'embryons de Mouton (30 à 40 cm), matériel mieux adapté à des recherches quantitatives que les os de Rat rachitique, dont l'aptitude à fixer des sels phosphocalciques est inférieure à celle des os normaux². Les coupes de tissu immergées dans des solutions renfermant à des concentrations identiques en phosphore et en calcium ($\text{Ca} \times \text{P} = 50$) du chlorure de calcium et, soit du phosphate disodique, soit du β -glycérophosphate de sodium, fixent des ions Ca^{++} et $\text{PO}_4^{=}$ selon des modalités dont rend compte l'examen de la figure 3. Comme l'indiquent les courbes 3 et 4 de celle-ci, les coupes osseuses fixent simultanément du calcium et du phosphore à partir des solutions renfermant des ions $\text{PO}_4^{=}$ et Ca^{++}

¹ J. ROCHE et G.-H. DELTOUR, Bull. Soc. Chim. biol. (Trav.) 25, 1260 (1943).

² V. VON KRAEMER, B. LANDTMAN et P. E. SIMOLA, Act. physiol. Scand. I, 285, 1940; J. ROCHE et M.-T. SIMONOT, Enzymologie 10, 239 (1942).

selon un rythme assez régulier. La valeur du rapport : Ca fixé/P fixé correspond alors à la formation probable de phosphate bicalcique plus ou moins mélangé à du phosphate tricalcique. La comparaison des courbes 1

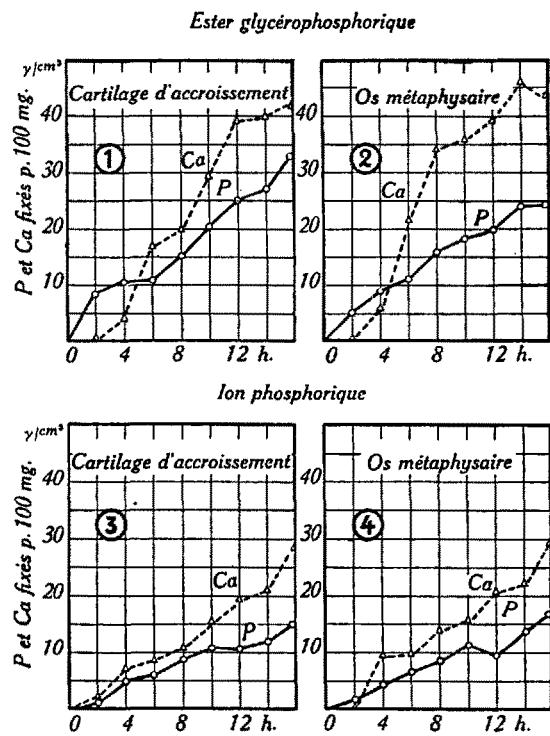


Fig. 3. Fixation des ions PO_4^{3-} et Ca^{++} *in vitro* par le cartilage d'accroissement et l'os métaphysaire de fémurs et de tibias d'embryons de Mouton (30 à 40 cm) à partir de solutions renfermant Ca^{++} (10 mg Ca par 100 cm^3) et soit du phosphate disodique, soit du β -glycérophosphate de sodium (5 mg P par 100 cm^3) à 37°C et à $p_{\text{H}} = 7,2$. — Abscisses: temps en heures. Ordonnées: gamma P et Ca fixés par 100 mg de tissu et par cm^3 de solution.

(D'après ROCHE et DELTOUR.)

et 2 aux précédentes permet de dégager le rôle de la phosphatase dans ces expériences, en se basant sur les faits suivants. D'une part, la quantité de phosphore fixée à partir de l'ester est beaucoup plus grande que celle disparaissant de la solution nutritive renfermant des phosphates minéraux en quantité équivalente. D'autre part, la rétention de cet excès de phosphore va de pair avec celle d'un excès de calcium, l'absence de parallélisme observée pendant les premières heures de l'expérience pouvant être momentanément négligée. Dès lors, la phosphatase assume deux rôles: elle réalise par son action sur l'ester un enrichissement direct du tissu osseux en ions phosphoriques et provoque ainsi indirectement un afflux d'ions calcium vers celui-ci. Le premier de ces rôles correspond au mécanisme d'action de l'enzyme objectivé par le schéma de ROBISON; le second lui est en quelque sorte complémentaire et permet à la phosphatase d'assurer sa fonction physiologique.

Un ensemble de travaux récents a fourni des données d'un intérêt certain au sujet de l'origine du substrat physiologique de la phosphatase. La pauvreté

du plasma sanguin et des humeurs dérivées en esters phosphoriques permettait de penser qu'il doit exister une autre source de ceux-ci, tout au moins dans les périodes de calcification rapide. Or, les os embryonnaires renferment du glycogène et le système enzymatique phosphorylant celui-ci (GLOCK; GUTMANN et collaborateurs) et l'on peut dès lors penser que, l'action de la phosphorylase donnant naissance à l'acide glucose-1-phosphorique aux dépens du glycogène et des phosphates humoraux, la formation de l'ester *in situ* joue un rôle important dans l'ossification. Elle permettrait en quelque sorte l'entrée des radicaux phosphoriques dans le cycle de celle-ci en quantité beaucoup plus grande que celle pouvant provenir directement des humeurs sous forme d'ion PO_4^{3-} ou d'esters. La phosphorylase est probablement, de ce fait, un auxiliaire important de la phosphatase, son action renforçant celle de cette dernière grâce à la formation locale de glucose-1-phosphate. Le drainage, l'appel vers l'os, des ions calcium présents dans les humeurs lorsque des ions phosphoriques se forment *in situ* aux dépens d'esters sanguins ou osseux et apparaissent alors à concentration élevée, permet la précipitation d'un phosphate de calcium $-\text{PO}_4\text{CaH}$, $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ ou leur mélange. Ainsi, le produit de solubilité des ions phosphorique et calcium régit le dépôt du «sel de l'os» primitif selon les lois générales de la formation des précipités de ce type, mais seules les conditions particulières du ravitaillement en ces ions réalisées dans les os permettent leur calcification à un rythme physiologique, parfois très rapide. L'apport sanguin direct d'ions PO_4^{3-} et Ca^{++} ne peut par lui-même assurer qu'une sorte d'entretien du matériel minéral de l'os.

Si démonstratives que soient les expériences que l'on vient de décrire, on peut se demander si elles ne réalisent pas seulement un «modèle» de calcification à beaucoup d'égards artificiel. Il convient, après en avoir résumé les résultats, d'en dégager la signification dans le cadre général de l'ossification et non plus seulement dans celui de la calcification proprement dite. C'est là le but de la seconde partie de cet exposé.

2^e Le rôle de la phosphatase dans l'ossification et le mécanisme général de celle-ci

La formation de la substance osseuse comporte une série d'étapes dont la calcification est la dernière et, bien que la fonction de la phosphatase soit importante, elle ne saurait assurer à elle seule la minéralisation des pièces squelettiques¹. Par ailleurs, la synthèse et l'évolution du support protéique des sels osseux sont de toute évidence indépendants de l'activité de cet

¹ A. POLICARD et J. ROCHE, Ann. Physiol. et Physicochim. biol. 13, 645 (1937) (Rapport présenté à la réunion de l'Association des Physiologistes de langue française).

enzyme. Aussi doit-on, connaissant le *mécanisme d'action* de la phosphatase, chercher à définir sa *fondation physiologique*.

A) Les «deux mécanismes» de la calcification (ROBISON). Dès le début de ses recherches, ROBISON s'efforça de montrer que l'activité de la phosphatase et l'aptitude de la substance osseuse à se calcifier ne sont pas nécessairement liées. De nombreuses expériences (ROBISON et ROSENHEIM; ROBISON, MACLEOD et ROSENHEIM) ont en effet permis d'inhiber l'enzyme en respectant l'affinité de la substance osseuse pour les sels ou de conserver l'activité phosphatasique en détruisant la propriété grâce, à laquelle les protéines osseuses fixent des sels phosphocalciques. Par exemple, la phosphatase demeure active en présence d'acide monoiodacétique ($M/10000-M/1000$) ou de fluorures alcalins ($M/5000-M/1000$), tandis que ces corps gênent fortement la calcification de coupes d'épiphyses tibiales de jeune Rat rachitique immergées dans des solutions d'hexosemonophosphate de calcium. La présence de cyanure de potassium ($M/1000$), le traitement préalable des coupes par l'acétone, le chloroforme, empêchent la calcification par les ions Ca^{++} et $\text{PO}_4^{=}$, mais non celle par l'hexosemonophosphate de calcium¹; mais ce fait peut ne tenir qu'à une dénaturation de la couche superficielle des protéines de la coupe, les régions profondes intactes où l'enzyme exerce son action demeurant seules aptes à fixer les sels formés à leur niveau. L'étude de la teneur en phosphatase des os embryonnaires de Poulet² et de Lapin³ au cours de leur développement *in vitro* ou dans l'organisme⁴ et celle de la calcification des mêmes organes poursuivie parallèlement ont permis par la suite d'observer que l'activité phosphatasique présente en général une valeur élevée avant que des nodules calcifiés n'apparaissent⁵. On a signalé plus haut qu'il en est de même dans les dents des squales⁶. La conclusion des recherches poursuivies par ROBISON et ses élèves a été formulée de la manière suivante par le premier: «Les résultats de ces expériences disloquent deux *mécanismes* dans la calcification du cartilage hypertrophique: le mécanisme phosphatasique qui réalise dans les humeurs osseuses une condition de sursaturation par rapport au sel de l'os grâce à l'hydrolyse des esters phosphoriques, et un second mécanisme qui favorise le dépôt du sel de l'os à partir de solutions inorganiques saturées, que la

condition de sursaturation soit due à l'hydrolyse enzymatique d'esters ou à la diffusion d'une solution sur-saturée. La nature de ce second facteur est inconnue. Il peut être une légère augmentation du p_{H} des humeurs due à l'établissement d'un équilibre de membrane, l'affinité spécifique du support protéique pour le calcium ou pour un autre constituant du sel de l'os ou quelque autre facteur favorisant le début de la cristallisation. Le fait qu'il est inhibé par KCN à de très faibles concentrations suggère l'hypothèse que l'activité des cellules y participe (loc. cit. p. 87.)» En fait, si la distinction faite par ROBISON est des plus pertinentes, elle ne doit pas être conservée sous la forme retenue par lui, car elle ne dissocie pas deux mécanismes, mais deux étapes de l'ossification. On ne saurait plus admettre qu'il existe un «mécanisme phosphatasique» de la calcification et un «second mécanisme» de celle-ci, dont le premier exigerait la participation de l'enzyme pour réaliser le même phénomène que le second, mais plutôt que le ravitaillement des os en ions $\text{PO}_4^{=}$ par la phosphatase est une phase de l'ossification et que la fixation du sel de l'os à la matrice protéique de la substance osseuse en est une autre, entièrement indépendante¹. Dès lors, on doit examiner dans son ensemble de mécanisme ostéogénétique pour définir la fonction physiologique de la phosphatase.

B) La théorie des «fixateurs du calcium» (PFAUNDLER; FREUDENBERG et GYÖRGYI). Toutes les théories qui permettent actuellement de se représenter la formation de la substance osseuse, sont en partie hypothétiques. Celle qui est le plus communément admise, dite «des fixateurs du calcium», a été suggérée par PFAUNDLER², puis énoncée par FREUDENBERG et GYÖRGYI à partir de leurs propres expériences sur la calcification artificielle du cartilage hyalin *in vitro*³. Cette conception a le mérite de coordonner des faits chimiques et histologiques, coordination qu'il est indispensable de réaliser, si l'on veut interpréter l'évolution de phénomènes, dont une partie seulement est accessible au biochimiste en l'état actuel de nos connaissances.

Les histologues ont depuis longtemps été frappés par les modifications des caractères de colorabilité de la substance préosseuse dans une période précédant immédiatement l'organisation de dépôts salins. Les protéines osseuses deviennent alors aptes à fixer les colorants basiques pour lesquels elles ne présentaient auparavant aucune affinité et elles sont par ailleurs le siège d'un cédème caractéristique (cédème préosseux de LERICHE et POLICARD). Ces manifestations tra-

¹ Il est peu probable que l'action énergique de ces corps dans les conditions expérimentales adoptées puisse être attribuée à leurs effets sur la formation du glucose-1-phosphate à partir du glycogène contenu dans les coupes d'os.

² H. B. FELL et R. ROBISON, Biochem. J. 23, 767 (1929) et 28, 2243 (1934).

³ R. ROBISON et G. F. S. NIVEN, Biochem. J. 28, 2337 (1934).

⁴ F. Moog, Biol. Bull. 86, 51 (1944).

⁵ L'apparition de la phosphatase dans les ébauches embryonnaires est simultanée à celle de cellules hypertrophiques dans leurs parties cartilagineuses.

⁶ J. ROCHE, E. BULLINGER et J. COLLET, Enzymologie 7, 273 (1939).¹

¹ F. C. MACLEAN et ses collaborateurs, reprenant récemment les travaux de ROBISON, ont dégagé de leurs expériences une conception plus claire, considérant le «second mécanisme» comme un «facteur local de la calcification». F. C. MACLEAN, M. A. LIPTON, W. BLOOM et E. S. G. BARRON, Travaux non publiés cités dans: F. C. MACLEAN, Ann. Rev. Physiol. 5, 79 (1943).

² M. PFAUNDLER, Jb. Kinderheilk. 17, 235 (1909).

³ E. FREUDENBERG et P. GYÖRGYI, Biochem. Z. 110, 290 (1920); 118, 30 (1921); 121, 130 (1921); 121, 142 (1921); 124, 299 (1921); 129, 134 (1922); 129, 138 (1922); 142, 407 (1923); 147, 191 (1924).

duisent nécessairement un remaniement profond des protéines osseuses en relation avec l'apparition de leur aptitude à se calcifier. FREUDENBERG et GYÖRGYI ont schématisé de la manière suivante le rôle des protéines dans l'ossification:

- Protéine + Ca^{++} → protéinate de calcium.
- Protéinate de calcium + phosphates → phosphoprotéinate de calcium.
- Phosphoprotéinate de calcium → phosphate tricalcique + protéine.

Ce schéma prévoit que, dans un premier temps, les protéines de la substance préosseuse s'unissent aux ions calcium qu'elles prélèvent dans les humeurs, jouant ainsi le rôle spécifique de «fixateurs du calcium». Après la formation de protéinates de calcium, ceux-ci se combineront à des ions phosphoriques d'origine sanguine, des phosphoprotéinates de calcium prenant naissance dans un second temps. Enfin, les remaniements protéiques correspondant histologiquement à la transformation de la substance préosseuse en substance osseuse libéreraient *in situ* à une concentration élevée des ions phosphorique et calcium, à partir desquels du phosphate tricalcique précipiterait nécessairement. C'est là, on le voit, une représentation très schématique des faits. Elle ne correspond pas dans son ensemble au mécanisme physiologique de la formation de la substance osseuse pour la raison suivante.

La base expérimentale de la théorie de FREUDENBERG et GYÖRGYI réside dans des recherches poursuivies sur la calcification *in vitro* du cartilage hyalin (articulaire ou costal) tissu ne devenant apte à donner naissance à de la substance osseuse qu'après avoir présenté des transformations histologiques et biochimiques profondes, dont on peut suivre l'évolution dans les diverses zones du cartilage de conjugaison¹. Des fragments de cartilage hyalin, à petites cellules, immergés dans des solutions neutres de phosphates alcalins ne fixent pas les ions $\text{PO}_4^{=}$ en quantité importante. Par contre, ils se combinent activement aux ions Ca^{++} , quand ils séjournent dans des solutions neutres de chlorure de calcium, cette affinité pour les ions Ca^{++} étant propre au cartilage, car les autres tissus animaux ne la présentent pas. Or, le cartilage hyalin chargé de calcium devient apte à se combiner à des ions $\text{PO}_4^{=}$, du fait même de la fixation antérieure du métal. En effet, le tissu immergé tout d'abord dans une solution de chlorure de calcium, puis dans une solution de phosphate disodique, présente rapidement une consistance analogue à celle de l'os, en raison de la précipitation dans son sein de phosphate tricalcique. Ce n'est là qu'une reproduction grossière de la calcification physiologique, ne présentant avec cette dernière que de lointaines analogies. En effet, les expériences de FREUDENBERG et

GYÖRGYI peuvent bien, comme je l'ai vérifié, être reproduites en mettant en œuvre du cartilage hyalin (partie juxtaépiphysaire de la zone d'accroissement des os longs d'embryons de Mouton), mais non du cartilage hypertrophique ou de la métaphyse (parties juxtadiaphysaires superposées de la même zone). Or, le premier ne se calcifie pas physiologiquement, tandis que le second et la troisième s'ossifient *in situ*.

Les différences que présentent à cet égard les diverses régions de la zone d'accroissement des os longs d'embryons de Mouton (30 à 40 cm) sont significatives. Les coupes d'os métaphysaire et de cartilage d'accroissement placées dans des solutions de $p_{\text{H}} = 7,2$ renfermant des ions Ca^{++} et $\text{PO}_4^{=}$ ($\text{Ca} \times \text{P} = 50$) à 37°C, fixent simultanément ces deux ions dans un rapport assez voisin de celui traduisant la formation de phosphate bicalcique ou d'un mélange de phosphates bi- et tricalcique. Le même essai reproduit avec des coupes de cartilage hyalin (zone juxtaépiphysaire du cartilage de conjugaison) conduit à des résultats tout autres, à savoir: la fixation d'une quantité beaucoup moindre de calcium par unité de poids de tissu et celle de traces de phosphates¹. Les observations de FREUDENBERG et GYÖRGYI traduisent donc le comportement de régions osseuses non calcifiables, mais non celui de la substance osseuse; aussi la théorie de ces auteurs ne doit-elle pas être retenue dans son ensemble.

C) *Le mécanisme général de l'ossification.* Le caractère continu de la formation de la substance osseuse rend quelque peu artificielle la distinction d'étapes dans ce processus; elle est néanmoins à bien des égards légitime. On peut en effet étudier de déceler avec une netteté particulière la succession de ces étapes dans les diverses régions, histologiquement différentes, du cartilage de conjugaison des os longs, dans les pièces squelettiques embryonnaires ou pendant la formation des cals de fracture. Dans les deux premiers cas, un même organe contient des territoires aux divers stades, de l'ossification; dans le second, ceux-ci se succèdent dans le temps sur un même tissu.

On distingue histologiquement dans la genèse du tissu osseux l'organisation d'une matrice protéique, son évolution comportant la transformation de la substance préosseuse en substance osseuse (œdème préosseux, apparition du caractère basophile) et sa calcification; cette dernière est nécessairement précédée de la formation de phosphates de calcium qui se fixent par la suite à un support organique, en sorte que quatre phases se succèdent dans l'ossification. On ne peut pas encore préciser leurs divers aspects biochimiques, mais on a cherché à les caractériser en étudiant la composition et l'activité phosphatasique de l'os au cours des premières étapes de sa formation. Les travaux poursuivis dans ce but sur les os de réparation (cals

¹ A. POLICARD, L'appareil de croissance des os longs. Ses mécanismes à l'état normal et pathologique, 1 vol., 216 p., Masson & Cie, éd., Paris 1941.

¹ J. ROCHE et G.-H. DELTOUR, Bull. Soc. Chim. biol. (Trav.) 25, 1260 (1943).

de fracture) et embryonnaires sont à cet égard des plus significatifs, comme en rend compte l'examen de la figure 4 et du tableau 1, où l'on trouvera quelques exemples de données déterminées par mes collaborateurs MARTIN-POGGI et MOURGUE^{1,2}.

La première étape de la formation du support protéique pose des problèmes peu accessibles au biochimiste. Elle consiste en l'organisation d'un tissu, dont une partie donne par la suite naissance à la substance osseuse, matériel élémentaire, des pièces squelettiques. Ce tissu peut avoir des origines diverses: cartilage hyalin dans l'appareil de croissance des os longs, conjonctif musculaire dans les cals des fractures, épithélium vésical dans certaines ossifications hétérotropiques

¹ J. ROCHE et R. MARTIN-POGGI, Bull. Soc. Chim. Biol. (Trav.) 23, 1543 (1941); J. ROCHE et M. MOURGUE, Bull. Chim. Biol. (Trav.) 23, 1149 (1941) et ibid., 24, 1186 (1942).

² Les recherches histochimiques de DANIELLI et FELL, de BOURNE, de MOOG, de GOMORI ont montré le rôle d'une phosphatase dans la formation du tissu conjonctif au cours de divers processus cicatrisants et dans la genèse du cal conjonctif et au cours de la différenciation embryonnaire des cellules dans les ébauches osseuses. L'activité de cet enzyme ne saurait être confondue avec celle de la «phosphatase des os» se manifestant par la suite, d'ailleurs avec une intensité beaucoup plus grande.

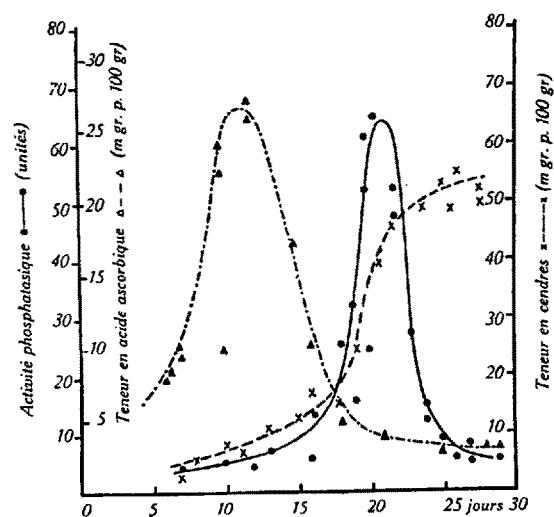


Fig. 4. Variations de la teneur en acide ascorbique et en cendres et de l'activité phosphatasique du cal, en fonction du temps écoulé depuis la fracture (radius de Cobaye). — Abscisses: nombre de jours après la fracture. Ordonnées: activité phosphatasique (unités par 100 mg d'azote protéique), teneur en acide ascorbique (mg par 100 g) et en cendres (par 100 du poids sec). (D'après ROCHE et MARTIN-POGGI et documents inédits.)

Tableau 1

Teneurs en eau, cendres, calcium et phosphore et rapport: Ca/P de pièces squelettiques d'origines diverses en cours de développement. (D'après ROCHE et MOURGUE).

Organe et région	Eau pour 100 (poids frais)	Cendres pour 100 (poids sec)	Ca pour 100 (poids sec)	P pour 100 (poids sec)	Rapport: Ca/P
I. Dent du Squale: <i>Carcarodon lamia</i> Risso					
(dent du cinquième rang, légèrement indurée au sommet, corps très mou)					
Base (très molle)	85,6	17,81	0,85	0,89	0,98
Zone sus-jacente (molle)	86,5	16,66	1,12	1,23	0,92
Zone sus-jacente (molle) 2	85,8	19,35	2,32	2,19	1,06
Zone sus-jacente (molle) 3	79,5	28,77	7,12	4,43	1,61
Pointe (légèrement indurée)	62,9	60,81	20,69	10,49	1,96
II. Os et dents embryonnaires de <i>Capra hircus hircus</i> L.					
(embryon de Chèvre de 25 cm)					
Omoplate, zone molle	49,5	10,58	0,54	0,86	0,62
Omoplate, zone dure	37,5	54,94	21,70	10,14	2,13
Fémur, épiphysè supérieure (molle) .	57,3	11,76	1,35	1,90	0,69
diaphyse (dure)	31,1	68,88	27,66	12,54	2,20
métaphyse (dure)	14,5	56,11	24,31	11,43	2,12
Dents, molles	71,6	14,28	3,21	2,78	1,15
molles	84,9	28,99	2,03	1,84	1,10
début de la calcification	23,0	28,00	7,36	4,68	1,58
III. Cals de fracture expérimentale de l'humérus de <i>Columba livia</i> adulte					
7 jours après fracture (cal conjonctif)	82,2	4,02	0,74	0,82	0,90
14 jours après fracture (cal conjonctif)	80,6	13,00	2,35	1,75	1,34
18 jours après fracture (cal conjonctif)	72,2	19,41	4,83	2,89	1,67
18 jours après fracture (début de l'ossif.)	58,8	23,70	7,26	3,41	2,12
20 jours après fracture (cal osseux) .	19,4	50,32	19,10	9,10	2,12
24 jours après fracture (cal osseux) .	16,2	44,66	14,34	7,18	1,99
28 jours après fracture (cal osseux) .	14,4	45,90	17,01	8,17	2,08
40 jours après fracture (cal osseux) .	12,2	53,22	20,09	9,71	2,06
46 jours après fracture (cal osseux) .	12,0	62,15	23,60	11,40	2,05

expérimentales. De récents travaux montrent que la différenciation de ces derniers est sous la dépendance d'un organisateur chimique présent dans l'extrait alcoolique des os en voie de croissance¹, l'injection de cette «ostéogénine» dans les muscles du Lapin y provoquant la formation d'ostéomes². L'acide ascorbique contrôle la formation de la matrice protéique des os et des dents³, son action sur la croissance des fibres conjonctives étant bien connue depuis le travail fondamental de WOLBACH et HOWE. Aussi s'explique-t-on que la vitamine C s'accumule progressivement dans les cals pendant que leur trame conjonctive s'organise, comme le montre l'examen de la figure 4. Ce stockage d'acide ascorbique devient par la suite de moins en moins grand, en sorte que son existence et son évolution constituent un *test chimique de la première phase de l'ossification*. Le rôle favorable de ce produit sur l'évolution des fractures expérimentales du Cobaye est sans conteste dû à son action sur le développement du cal au cours de celle-ci⁴.

La seconde étape de l'ossification comporte des phénomènes à la fois plus spécifiques et plus faciles à définir chimiquement. Elle est caractérisée par la genèse du mécanisme préparatoire à la calcification, soit, sur le plan chimique, par l'apparition de la phosphatase et par l'accumulation de phosphore et de calcium dans la substance préosseuse. On peut en effet constater sur la figure 4 que l'activité phosphatasique des cals n'est importante qu'après une longue période préliminaire, mais qu'elle augmente alors rapidement. Il en est de même au cours du développement des os embryonnaires et des dents, comme on l'a vu plus haut. L'hydrolyse enzymatique des esters phosphoriques dans la substance préosseuse ne conduit pas alors à la calcification proprement dite, car la matrice protéique n'est pas encore douée de la propriété spécifique de fixer les phosphates de calcium insolubles. Elle a pour conséquence un enrichissement en phosphore plus important que celui en calcium, les ions $P_4O^{=}$ et Ca^{++} se combinant probablement aux protéines osseuses.

Cette manière de voir découle des observations suivantes. L'étude de la composition des os embryonnaires, des dents en voie de calcification et des cals de fracture avant leur «prise», montre qu'ils présentent tous un enrichissement en phosphore, et à un degré moindre en calcium, antérieur à la formation dans leur masse de précipités concrets de phosphates de calcium⁵.

¹ G. LEVANDER, Nature 155, 148 (1945), et P. LACROIX, Nature 156, 576 (1945).

² G. LEVANDER, Surg. Gyn. and Obstetr. 67, 705 (1938) et Klin. Wschr. 20, 40 (1941).

³ A. DJABRI, Z. Vitaminforsch. 10, 210 (1940). — E. W. FISH et L. J. HARRISS, Phil. Trans. Roy. Soc., London 223, 489 (1934). — G. MOURQUAND, M. DAUVERGNE et V. EDEL, C. r. Soc. Biol., 130, 667 (1939).

⁴ J. ROCHE et R. MARTIN-POGGI, Bull. Acad. Med. 126, 16 (1942); G. BOURNE, J. Physiol. 102, 319 (1943).

⁵ J. ROCHE et M. MOURQUAND, Bull. Soc. Chim. biol. (Trav.) 24, 1186 (1942). — M. J. DALLEMAGNE, Act. biol. Belg. 2, 298 (1942).

Les exemples de résultats réunis dans le tableau 1 sont à cet égard significatifs. La valeur du rapport Ca/P, souvent inférieure à 1 dans diverses pièces squelettiques en voie de calcification, y traduit la présence d'un fort excès de phosphore ne pouvant pas être compris dans du phosphate tricalcique ($Ca/P = 1,93$ dans $(PO_4)_2Ca_3$) ou même, parfois dans du phosphate bicalcique ($Ca/P = 1,29$ dans PO_4CaH). Par ailleurs, l'étude histochimique des cals révèle l'existence d'une surcharge en phosphates antérieure à la fixation de quantités importantes de calcium¹. En rapprochant ces données, d'une part des remarques faites par LOGAN et ses collaborateurs² sur la solubilisation des ions $PO_4^{=}$ et Ca^{++} à partir de fragments osseux *in vitro* et sur la fixation des mêmes ions par ceux-ci, lorsqu'ils sont immergés dans du sérum et, d'autre part, de la rétention préférentielle des phosphates au début de la calcification *in vitro* en présence d'esters phosphoriques (voir figure 3), on peut légitimement conclure que la substance préosseuse fixe séparément les ions calcium et phosphoriques. Comme il ne semble pas exister alors de rapport stœchiométrique fixe entre les quantités de phosphore et de calcium présentes et que la valeur du quotient: Ca/P est initialement inférieure à celle correspondant à la présence de phosphate tricalcique ou même bicalcique, l'hypothèse de la formation de protéinates de calcium et de phosphates de protéines — ou de phosphoprotéinates de calcium — est alors plausible. *Les caractères chimiques de cette phase de l'ossification sont donc: l'apparition d'une activité phosphatasique intense et, en conséquence, la fixation d'un excès de phosphates sur la substance préosseuse.* A cet égard, les faits expérimentaux observés sont en contradiction avec la théorie des «fixateurs du calcium» en ce sens qu'ils conduisent à dénier à celui-ci le rôle d'élément initiateur de la minéralisation des os et à l'attribuer aux phosphates.

Pendant cette étape, les protéines présentent déjà une spécificité caractérisée, puisqu'elles sont aptes à se combiner à des quantités importantes d'éléments minéraux, alors qu'elles ne l'étaient pas auparavant. La présence de phosphate tricalcique dans les nodules d'ossification dès leur formation ($Ca/P = 1,93$ et au-delà, jusqu'à 2,20 environ — ce qui est encore considéré par de nombreux auteurs comme un indice de l'existence de carbonatoapatite, $3(PO_4)_2Ca \cdot CO_3Ca$) et celle d'un excès de phosphore à un stade antérieur (Ca/P notablement inférieur à 1,93) marque une différence assez nette entre la dernière phase de l'évolution de la substance préosseuse et sa transformation complète en substance osseuse, à ceci près que l'ana-

¹ A. CRETIN, Recherches sur l'ossification et la réparation des fractures, 1 vol., 351 p., Imprim. instit. comm., éd., Le Mans 1925.

² M. A. LOGAN et L. K. KANE, J. biol. Chem. 127, 705 (1939). — M. A. LOGAN et H. L. TAYLOR, ibid. 119, 293 (1937) et 125, 377 (1938).

lyse chimique des pièces en cours de calcification porte toujours sur des territoires où l'on ne peut pas espérer étudier à l'état pur une seule de ces phases.

Les deux dernières étapes évoluent simultanément et de manière beaucoup plus rapide, car le dépôt des sels a lieu dès que les protéines osseuses manifestent l'aptitude à fixer les phosphates de calcium insolubles propre à la substance osseuse, et cela grâce à l'existence de la phosphatase et d'une réserve en matériel phosphocalcique constituée antérieurement. Le troisième stade de l'ossification est celui que les histologues désignent sous le nom de «transformation de la substance préosseuse en substance osseuse». La modification de colorabilité des protéines qui caractérise son début, a été signalée plus haut. Elle traduit un phénomène ne se prêtant pas à une étude chimique, car notre connaissance des protéines osseuses est très réduite et l'on ne peut pas espérer définir leur remaniements structuraux en l'état actuel de nos méthodes. Seules les conséquences physiologiques de ces remaniements nous apparaissent. La théorie de FREUDENBERG et GYÖRGYI prévoit qu'ils vont de pair avec la mise en liberté des radicaux phosphoriques et du calcium antérieurement fixés, lesquels peuvent alors s'unir pour donner naissance à un phosphate de calcium insoluble. La rapidité de la «prise» des os ne saurait s'expliquer que s'il s'est constitué antérieurement une réserve locale en éléments minéraux susceptibles de participer à la formation de ce phosphate et si un mécanisme efficace de ravitaillement en ions phosphorique et calcium est alors présent pour permettre l'enrichissement en sels des os. La calcification proprement dite, dernière étape de l'ossification, met en jeu l'une et l'autre.

Elle comporte l'apparition de précipités constitués probablement par du phosphate bicalcique, PO_4Ca_2 , aux dépens duquel du phosphate tricalcique, $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$, prend très rapidement naissance¹. La phosphatase est l'élément actif de ce phénomène, dont le terme paraît être le dépôt de phosphate tricalcique α , $3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3 \cdot \text{H}_2(\text{OH})_2$ ². Elle en régit l'intensité par le mécanisme étudié plus haut, la formation d'ions $\text{PO}_4^{=}$ au niveau de la substance osseuse provoquant un appel des ions Ca^{++} des humeurs et, par là même, secondairement, la précipitation d'un phosphate de calcium dès que le produit de solubilité de ces ions est atteint. Le rôle prédominant des ions $\text{PO}_4^{=}$ est donc manifeste, puisque c'est grâce à leur présence à un taux élevé au niveau de la substance osseuse que les ions Ca^{++} des humeurs sont drainés vers celle-ci. Sur ce point encore, la théorie des «fixateurs du calcium» est en désaccord avec l'expérience. Quant à l'activité enzymatique de la subs-

tance osseuse, elle est maxima au début de la calcification et immédiatement avant (figure 4); elle diminue très rapidement par la suite, dès que le tissu présente la teneur élevée en sels et la rigidité propre à la substance osseuse. *La dernière étape de l'ossification est donc caractérisée par une activité phosphatasique élevée de la substance osseuse et par un enrichissement brusque et important de celle-ci en sels dont le rapport Ca/P est égal ou peu supérieur à 1,93.*

L'apparition de l'aptitude spécifique de la matrice protéique à fixer les phosphates de calcium insolubles est aussi particulière à cette période terminale, mais son étude demeure très délicate. Les seuls essais tentés pour l'aborder, jusqu'ici très limités, ont néanmoins déjà permis de montrer que la carence en vitamine D réduit l'affinité des os pour les sels, tandis que l'administration de cette vitamine la restaure chez le Rat carencé¹ et que les fluorures gênent la fixation des phosphates².

3^e Conclusions générales

La phosphatase est un élément important du mécanisme de la formation de la substance fondamentale des os et des dents et son activité régit la calcification de cette dernière qui, sans elle, ne pourrait avoir lieu qu'à une très faible vitesse, à partir des ions $\text{PO}_4^{=}$ et Ca^{++} des humeurs. Sa fonction physiologique est donc d'accélérer un phénomène dont l'intensité est liée à l'activité de l'enzyme, mais dont l'existence est indépendante de celle-ci. C'est dire que l'étude biochimique de l'ossification ne saurait être considérée comme près de son terme en raison des connaissances acquises sur le rôle de la phosphatase et sur la nature des constituants minéraux du squelette.

Les faits discutés dans la seconde partie de cet exposé font ressortir le rôle prédominant joué par les protéines dans la formation de la substance osseuse. L'étude de ces corps et de leur évolution doit, de toute évidence, être le principal objet des recherches dont on peut attendre d'importants progrès dans nos connaissances. Comme celle de la phosphatase, elle ne pourra être menée à bien que grâce à la coordination d'observations histologiques, physiologiques et biochimiques, coordination indispensable pour se représenter avec précision chacune des étapes de la formation de la substance osseuse. La biochimie a pour rôle dans ce domaine de définir la constitution et les propriétés des corps organiques ou minéraux participant à des structures et d'étudier le mécanisme des réactions qui leur donnent naissance. Elle ne peut le remplir sans le secours de l'histologie et de la physio-

¹ M. J. SHEAR et B. KRAMER, J. biol. Chem. 68, 761 (1928). — J. ETTORI, R. GRANGAUD, J. BENOIT et J. CLAVERT, Bull. Soc. Chim. biol. (Tr.v.) 24, 1323 (1942).

² M. J. DALLEMAGNE et H. BRASSEUR, Bull. Soc. Roy. Sci. de Liège 11, 451 et 488 (1942).

¹ V. VON KRAMER, B. LANDTMANN et P. E. SIMOLA, Act. physiol. Scand. 1, 285 (1940). — J. ROCHE et M.-T. SIMONOT, Bull. Acad. Med. 125, 272 (1941).

² J. ROCHE et G.-H. DELTOUR, C. r. Soc. Biol. 137, 531 (1943).

logie, car les données acquises par celles-ci ouvrent souvent la voie à la recherche biochimique, parfois avant que celle-ci ne soit techniquement réalisable, et confèrent par la suite tout leur sens biologique à ses résultats.

Summary

A general survey of the actual knowledges on the bone phosphatase is given. The enzyme plays an important rôle in the calcification of bone and teeth, this

process being unable to proceed at a physiological speed without the participation of a phosphatase. The biological function of the enzyme is thus to accelerate and not to promote the calcification.

The knowledge of the mechanism of phosphatase activity in the skeletal organs and of the chemical composition of the bone salt cannot lead to a full understanding of the physiology of ossification. A prominent function in this field is devoted to the proteins of the ground substance of bone and to their evolution. The study of the protein matrix of bone is now the most important subject of work for the biochemistry of ossification.

Neuformulierung der Kristallographie

Von PAUL NIGGLI, Zürich

1. Die Grundlagen

Die Symbole für Symmetrieelemente und Deckoperationen in der Kristall- und Punktsymmetrielehre sind, obwohl mannigfache Varianten bestehen, bei näherem Zusehen unzweckmäßig und unlogisch. Symmetriegruppen der gleichen Ordnung z , d.h. der gleichen Zähligkeit gleichwertiger Elemente (Punkt, Gerade, Fläche) allgemeiner Lage, werden durch unterschiedliche Anzahlen von Symmetrieelementen oder Deckoperationen charakterisiert, z.B.:

Schoenflies	Mauguin	Ausgeschriebene Symmetriiformel
C_{4v}	durch 4 mm	$1\square+(2+2)SE$
C_{4h}	durch $\frac{4}{m}$	$1\square+1SE+Z$

Dabei müssen in beiden Fällen, um von einem Punkt im Einzelschritt zu allen anderen gleichwertigen Punkten zu gelangen, gleichviel Einzeloperationen ausgeführt werden. Uneinheitlich und in der Symbolik oft unlogisch ist die Bezeichnung der sogenannten Inversions- und Spiegelgyroiden. Geht man von den Punktsymmetriegruppen zu den (kristallstrukturell wichtigen) Raumsymmetriegruppen über, so erkennt man, daß in gewissen Deckoperationen andere versteckt enthalten sind, die nun selbstständig werden. Und will man schließlich rechnen und Aufgaben der Kristallsymmetrielehre und Stereochemie mathematisch lösen, so erweist sich die übliche Sprache der Kristallographen als unzweckmäßig. Das ist wohl jedem Hochschullehrer im Unterricht aufgefallen.

Durch den Ausbau und die grundsätzliche korrelative Entwicklung eines ersten Versuches von G. PÓLYA¹ gelingt es, eine neue, einwandfreie Formulierung zu schaffen, mit deren Hilfe sich alle wesentlichen Fragen

der Punktsymmetrielehre unmittelbar mathematisch lösen lassen. Die neuen Prinzipien sollen im folgenden dargelegt werden¹.

Sind in bezug auf eine Punktsymmetriegruppe z Punkte allgemeiner Lage einander gleichwertig, so denkt man sich zunächst diese willkürlich numeriert von 1, 2 ... bis $(z-1)$ und z und sucht nun die einzelnen Operationen auf, die 1 in 1, 1 in 2, 1 in 3, 1 in 4, ..., 1 in n , 1 in z überführen. Das ergibt z Operationen. Führt eine Operation den Punkt in sich selbst über, so ist sie von *unärem* Charakter; führt sie erst nach zweimaliger Wiederholung zum Ursprungspunkt zurück, so kommt ihr *binäres* Verhalten zu. Ist sie so beschaffen, daß erst nach m -maliger Wiederholung der Ausgangspunkt erreicht wird, so ist sie m -fach *polynär*, z.B. mit $m=3$ *ternär*, $m=4$ *quaternär*, $m=5$ *quinär*, $m=6$ *senär* usw. Die unäre Operation besitzt für sich die Ordnungszahl 1, die binäre 2, die ternäre 3 usw. Jede mehr als binäre Operation wird eine einfache Drehung enthalten. Sind voraussetzungsgemäß alle z Punkte einander gleichwertig, so muß eine Symmetrioperation von der Ordnungszahl m die Punktmenge z in $\frac{z}{m} = n$ Zyklen zerlegen; d.h. es werden von der fortgesetzten Operation m Punkte erfaßt, bis wieder 1 auf 1 fällt, und die Gesamtmenge z muß aus n solchen m -Zyklen bestehen. Es ist $n \cdot m = z$. Eine derartige Deckoperation erhält nun ganz allgemein das Symbol

¹ Wie ersichtlich sein wird, handelt es sich um die Auswertung gruppen- und zahlentheoretischer Probleme. Manches ließe sich mit Hilfe der abstrakten Gruppentheorie weit einfacher formulieren. Allein die Lehre von den Punktsymmetriegruppen ist ein völlig in sich abgeschlossenes Gebiet, innerhalb dessen gegenüber der allgemeinen Gruppentheorie Selektionsprinzipien wirksam sind. Deshalb wäre es unzweckmäßig, vom Allgemeinfall auszugehen. Ja es hat die Übertragung der Lehre von den Permutationen ohne Rücksichtnahme auf die Symmetrielehre verhindert, einfache Zusammenhänge zu erkennen. Der Mathematiker wird leicht die Einordnung vornehmen können und sich dann auch nicht daran stoßen, daß gewisse Begriffe spezialisiert aufgefaßt wurden.

¹ Siehe darüber in P. NIGGLI, Grundlagen der Stereochemie, Birkhäuser, Basel 1945.