

Zn⁶⁵ et calcification du squelette

L'histochemie a tout récemment démontré¹ la présence élective de zinc dans les structures squelettiques en voie de calcification. S'il existe normalement du zinc dans ces tissus, il est naturel de se demander si le radiozinc administré à l'animal y est détecté par la méthode autoradiographique. On sait déjà² que l'os accumule et retient longtemps le Zn⁶⁵. Mais on ignore le mode de distribution de cet élément à l'échelle histologique.

Nous avons injecté par voie intraveineuse à quatre jeunes singes de l'espèce *Cercocebus agilis* une solution de chlorure de Zn⁶⁵ de haute activité spécifique (7918 mC/g de zinc), à raison de 1,5 mC/kg d'animal. Les os longs ont été prélevés à divers intervalles et fixés dans de l'éthanol à 95°. Des coupes ont été obtenues par usure de tranches transversales des diaphyses.

La présente note se borne à relever quelques observations recueillies dans l'os compact, principalement au stade de cinq jours après l'injection de Zn⁶⁵.

La Figure 1 reproduit à faible grossissement l'image autoradiographique laissée par une coupe sur un film Dentus Rapid (Gevaert) après une exposition de 10 jours. Le cliché est parsemé d'empreintes annulaires. Le long du bord médullaire, une traînée radioactive répond à une surface où s'appose de l'os nouveau.

L'interprétation précise des taches radioactives sera proposée dans un instant. Il faut d'abord attirer l'attention sur les espaces apparemment non radioactifs. La densité des grains d'argent réduit n'y est pas plus élevée que dans les régions de l'émulsion qui n'ont pas été en contact avec la coupe.

Il ne s'agit pas d'une illusion puisque l'impression visuelle est confirmée par l'histophotomètre de Lison³: si l'on règle au zéro l'échelle des densités optiques pour le voile de fond du film (en dehors de la préparation), les lectures qui se rapportent au tissu intercalé entre les empreintes bien visibles ne s'écartent pas du zéro.

Au surplus, on ne peut incriminer un artifice photographique qui ferait seulement ressortir une radioactivité assez importante, mais ne révélerait pas une radioactivité faible. En effet, même après un contact prolongé entre la coupe et le film, l'histophotomètre n'indique pas le moindre noircissement en dehors des taches; celles-ci se sont évidemment empâtées et se prêtent mal dès lors à une illustration.

Enfin, une coupe provenant d'un animal sacrifié dix jours après l'injection apporte un nouvel argument pour l'absence de toute radioactivité décelable dans les zones qui n'impressionnent pas les émulsions photographiques. Toutes les empreintes radioactives dans l'épaisseur de la diaphyse y étaient par hasard groupées sur une surface réduite, tandis que le reste de la coupe n'avait laissé de traces qu'en bordure du périoste ou de la cavité médullaire. Cette disposition fortuite a permis de séparer aisément au bistouri sous le microscope le tissu contenant les structures radioactives et celui qui en paraissait dépourvu, à en juger par l'autoradiographie. Pour le petit fragment qui avait donné de belles marques autoradiographiques, on a trouvé, au compteur à scintillation, une valeur à peu près double de celle du back ground. Pour le reste de la coupe qui n'avait fourni aucune image autoradiographique et dont la surface était beaucoup plus étendue, le nombre de coups par minute ne dépassait pas le back ground.

On peut donc raisonnablement affirmer que le tissu osseux n'a pas retenu le Zn⁶⁵ en quantités décelables en dehors des empreintes localisées que montre l'autoradiographie. Reste à analyser ces dernières. La Figure 2 nous y invite, qui réunit l'autoradiographie (A), le négatif

microradiographique (B) et l'image histologique (C) d'une même région d'une coupe provenant du même stade de cinq jours. L'autoradiographie a été ici développée un mois après exposition sur un film Scientia 19 D 50 (Gevaert) dont le grain est sensiblement plus fin que celui du film Dentus Rapid.

Si nous superposons les deux premiers clichés (A et B), les marques radioactives coïncident avec des lamelles relativement peu calcifiées, qui, d'après la microradiographie,



Fig. 1. Autoradiographie d'une coupe transversale de tibia prélevé cinq jours après injection de Zn⁶⁵. Quelques empreintes annulaires et une traînée médullaire se détachent sur un fond uniformément clair où ne se décèle aucune trace de radioactivité. (× 10).

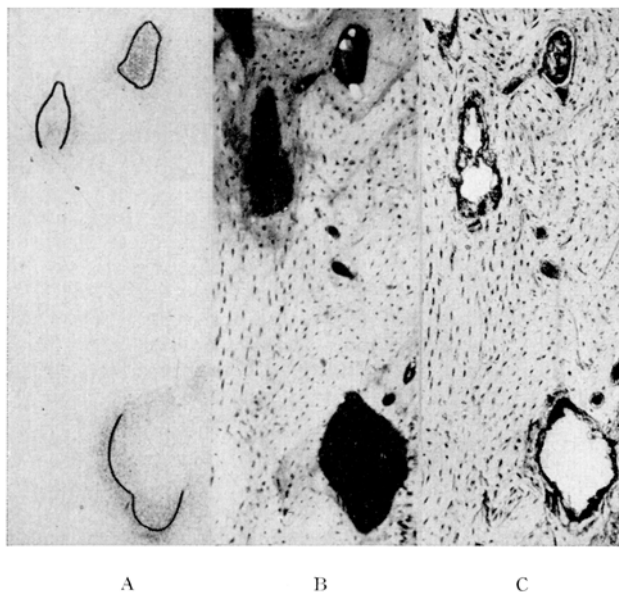


Fig. 2. Corrélations entre l'autoradiographie (A), la microradiographie (B) et l'image histologique (C) d'une coupe transversale d'humérus prélevé cinq jours après injection de Zn⁶⁵. La radioactivité appartient exclusivement à la limite du liséré préosseux bien colorée par le bleu de méthylène (C), décalquée sur l'autoradiographie (A) et répondant aux lamelles centrales relativement peu calcifiées visibles aux rayons X (B). (× 58).

¹ S. HAUMONT, J. Histochem. Cytochem. 9, 141 (1961).

² G. E. SHELIN, I. L. CHAIKOFF, H. B. JONES et M. L. MONTGOMERY, J. biol. Chem. 149, 139 (1943). – I. G. F. GILBERT et D. M. TAYLOR, Biochim. biophys. Acta 21, 545 (1956). – J. C. N. WAKELEY, B. MOFFATT, A. CROOK et J. R. MALLARD, Intern. J. appl. Rad. Isotopes 7, 225 (1960). – D. M. TAYLOR, Nature 189, 932 (1961).

³ Don de la Rockefeller Foundation.

bordent des canaux haversiens. Or le pourtour de ces cavités apparaît incomplet sur l'autoradiographie pour deux des ostéones radioactifs. L'image histologique de la coupe décalcifiée et colorée au bleu de méthylène à pH 4,8 (C) démontre un détail supplémentaire essentiel: la présence de Zn^{65} est liée à celle d'un liseré préosseux.

Ce liseré préosseux s'inscrit à l'intérieur des couches calcifiées, seules visibles sur la microradiographie. Ses affinités tinctoriales ont été étudiées dans le laboratoire de LACROIX⁴. C'est en périphérie de ce liseré, le long d'une «ligne-frontière» clairement indiquée par le bleu de méthylène, que la substance organique de l'os commence brusquement à se charger de sels minéraux. C'est cette limite périphérique des liserés préosseux qui a été décalquée et reportée à l'encre sur l'autoradiographie. Bien entendu, elle correspond au contour des canaux haversiens tel que le dessinent les rayons X. Si l'on néglige l'inévitable diffusion des traces autoradiographiques, on doit admettre que la radioactivité est localisée le long de la ligne-frontière.

Il est hors de doute que le Zn^{65} se dépose dans le tissu qui est sur le point ou en train de se calcifier. Ajoutons incidemment que le cartilage de croissance retient, lui aussi, du Zn^{65} (observations inédites). Certes cet élément n'est pas le seul à se comporter de la sorte. Qu'il suffise de citer le Ca^{45} , dont la distribution hétérogène est si bien illustrée par l'autoradiographie⁵, et certains colorants vitaux, parmi lesquels les tétracyclines ont fourni des images fluorescentes très démonstratives⁶.

Mais on a observé⁷ que les autoradiographies au Ca^{45} , en particulier quelques jours après l'injection, présentent un voile diffus qui traduit sans doute des réactions d'échanges. De même, d'autres radioéléments utilisés jusqu'à présent dans l'étude du métabolisme osseux peuvent démontrer les dépôts de substance minérale, mais ils se retrouvent aussi dans la masse du tissu déjà formé⁸. D'autre part, si l'on cherche un moyen d'évaluer par des mesures externes l'intensité des phénomènes de calcification dans une région déterminée du squelette, on ne peut, bien entendu, recourir au plomb⁹ ni aux tétracyclines.

Le zinc, dont les isotopes 65 et 69 émettent des rayons γ , offrirait le double avantage de marquer électivement les sites de minéralisation et de ne pas se fixer dans les tissus squelettiques déjà calcifiés.

Enfin, il n'est pas sans intérêt de mentionner que, chez un singe sacrifié trois mois après injection de Zn^{65} , la radioactivité appartient à des lamelles osseuses calcifiées et enfouies dans la profondeur du tissu. Le zinc s'incorpore donc dans l'os, mais il y reste soustrait aux échanges et masqué pour l'histochemie.

Summary. Five days after intravenous administration of Zn^{65} to young monkeys, autoradiograms of compact bone show that radioactivity is exclusively located at the frontier line, where preosseous tissue is becoming mineralized. Since no diffuse reaction can be detected at this stage in the pre-existing calcified bone, it is concluded that Zn^{65} is not exchanged with the constituents of bone tissue, but does indicate accretion of new mineral substance.

S. HAUMONT et J. VINCENT

Département d'Anatomie et d'Histologie, Université Lovanium, Léopoldville (Congo), le 16 mars 1961.

⁴ J. VINCENT, Arch. Biol. 65, 531 (1954); 68, 561 (1957). – P. LACROIX, in *Bone Structure and Metabolism* (Ed. Churchill, London 1956), p. 36. – C. P. LEBLOND, P. LACROIX, R. PONLOT et A. DHEM, Bull. Acad. Roy. Méd. Belg. 24, 421 (1959).

⁵ P. LACROIX, Bull. Acad. Roy. Méd. Belg. 18, 489 (1953); Second Radioisotope Conference 1, 134 (Ed. Butterworths, London 1954). – J. VINCENT, *Recherches sur la constitution de l'os adulte*, Thèse Université Louvain (Ed. Arscia, Bruxelles 1955).

⁶ J. P. GHOSEZ, Arch. Biol. 70, 169 (1959). – W. H. HARRIS, Nature 188, 1038 (1960).

⁷ J. S. ARNOLD, W. S. S. JEE et K. JOHNSON, Amer. J. Anat. 99, 291 (1956). – J. H. MARSHALL, R. E. ROWLAND et J. JOWSEY, Radiation Res. 10, 258 (1959). – R. PONLOT, *Le radiocalcium dans l'étude des os* (Ed. Arscia, Bruxelles, et Masson, Paris 1960).

⁸ R. E. ROWLAND, Clin. Orthop. 17, 146 (1960).

⁹ T. SATO, Gunma J. Med. Sci. 2, 183 (1953). – J. VINCENT, Rev. Belge Pathol. Méd. Expér. 26, 161 (1957).

Stereochemical and Polar Effects in Bromination of Androstan-3-one Mannich Bases

In a previous report¹ we outlined the preparation of Mannich bases of 3-ketosteroids. In particular, the preparation and configuration of 17 β -hydroxy-2 α -pyrrolidinomethyl-5 α -androstan-3-one (I) was established. This communication is concerned with the bromination of I and its 17 β -propionate ester (II) under thermodynamically and kinetically controlled conditions.

Bromination of I (or II) under thermodynamic control (excess hydrogen bromide in glacial acetic acid) gave rise to only one product, 4 α -bromo-17 β -hydroxy-2 α -pyrrolidinomethyl-5 α -androstan-3-one hydrobromide (III), m.p. 200–202°, $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ 282 m μ , strong carbonyl band in the infrared at 1728 cm⁻¹. Dehydrobromination of III with lithium chloride in dimethylformamide gave 17 β -hydroxy-2 α -pyrrolidinomethyl-4-androsten-3-one, which was identical with a sample prepared earlier in an unambiguous manner¹. Contrary to the findings of DJERASSI² et al., on the bromination of 2 α -methylcholestan-3-one under equilibrating conditions, we could not isolate, even in minute amounts, 2 β -bromo-17 β -hydroxy-2 α -pyrrolidino-

methyl-5 α -androstan-3-one (IV). This may be due to the strong positive charge on nitrogen.

The bromination of I and its enol acetate was then carried out under kinetically controlled conditions (carbon tetrachloride and/or acetic acid containing sodium acetate). Once again, only one α -bromoketone derivative, m.p. 169° was isolated. Dehydrobromination of this substance gave a dihydropyranyl dimeric steroid similar to the one previously described³ and a small amount of the Δ^1 derivative, m.p. 168–170° ($\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ 237 m μ , $\epsilon = 8000$). Thus, bromination had occurred at C₂. The infrared absorption spectrum of this bromoketone showed one strong band at 1710 cm⁻¹ and maximum absorption in the ultraviolet was found at 312–315 m μ . Therefore, the bromine is axially oriented leading to one of the conformations, each considered as the hydrobromide salt.

¹ G. DESTEVENS and A. HALAMANDARIS, J. org. Chem. 26, 1614 (1961).

² C. DJERASSI, N. FINCH, R. C. COOKSON, and C. W. BIRD, J. Amer. chem. Soc. 82, 5488 (1960).

³ R. MAULI, H. J. RINGOLD, and C. DJERASSI, J. Amer. chem. Soc. 82, 5494 (1960).