

La structure submicroscopique des dépôts de substance minérale dans la calcinose cutanée expérimentale (calciphylaxie)¹

L'étude des processus de calcification dans le tissu conjonctif a été grandement facilitée à la suite de la mise au point par SELYE² de méthodes permettant de provoquer expérimentalement une calcinose cutanée (calciphylaxie) chez le rat. Bien que de nombreux travaux aient été déjà publiés sur les caractéristiques histologiques et histo-chimiques des divers stades du développement de ces lésions, leur ultrastructure n'est pas encore connue. Le but de cette brève communication est de présenter quelques observations effectuées à ce sujet avec le microscope électronique, qui ont permis de préciser la structure submicroscopique des dépôts de substance minérale et leurs relations avec les fibrilles de collagène.

Des rats ♀ adultes ont été sensibilisés par le dihydro-tachystérol (Calcamine® Wander) administré par tubage gastrique à la dose de 1 mg par 100 g de poids corporel. Après 24 h, chaque animal a reçu une injection hypodermique déclenchante de FeCl₃ (0,05 mg par 100 g de poids corporel). Les animaux ont été sacrifiés une semaine plus tard. Le tissu conjonctif sous-cutané calcifié a été prélevé, fixé au permanganate de potassium à 0,6% tamponné à pH 7,4 selon LUFT³, inclus dans l'épon selon LUFT⁴ également. Les coupes ont été faites au couteau de diamant avec le microtome Porter-Blum, et observées au microscope électronique Philips EM 75 C avec ou sans coloration au plomb selon KARNOVSKY⁵.

Les cristaux de substance minérale (Figures 1 et 2) sont en forme de minces bâtonnets, d'un diamètre maximum de 5 nm et longs d'environ 50 nm. Ils sont déposés à la surface des fibrilles collagènes, isolées ou réunies en petits faisceaux de 140 à 420 nm de diamètre. Ils ne présentent pas d'orientation préférentielle par rapport à la direction des fibrilles, et leur répartition est sans relation nette avec la striation du collagène. Ils débordent les limites des

fibrilles collagènes et pénètrent plus ou moins radiairement dans la substance fondamentale interfibrillaire qui est d'aspect homogène. Les faisceaux de fibrilles collagènes non minéralisés se voient difficilement, car ils semblent masqués par la substance fondamentale qui apparaît beaucoup plus dense que dans les préparations témoins.

La substance minérale est constituée d'apatite, et donne un diagramme caractéristique de diffraction des rayons X.

Cette disposition des cristaux en forme de minces aiguilles, sans orientation régulière sur les fibrilles collagènes, est identique à celle observée lors de l'ossification de membrane au cours de la période foetale par ASCENZI et BENEDETTI⁶, YAEGER⁷, CAMERON⁸ et FRANK⁹, et dans l'os oestrogénique chez les oiseaux par ASCENZI, FRANÇOIS et BOCCIARELLI¹⁰. Mais les cristaux de substance minérale ne sont pas toujours uniquement localisés sur les fibrilles collagènes; souvent même, les dépôts les plus précoces de sels minéraux se forment dans la substance fondamentale, comme l'ont montré ASCENZI et BENEDETTI⁶. Lors de l'ossification en milieu conjonctif dans le maxillaire inférieur du fœtus de chat, FRANK⁹ a observé que la croissance

¹ Travail effectué avec l'aide du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique.

² H. SELYE, *Calciphylaxis* (The University of Chicago Press, Chicago 1962).

³ J. H. LUFT, J. biophys. biochem. Cytol. 2, 799 (1956).

⁴ J. H. LUFT, J. biophys. biochem. Cytol. 9, 409 (1961).

⁵ M. J. KARNOVSKY, J. biophys. biochem. Cytol. 11, 729 (1961).

⁶ A. ASCENZI et E. L. BENEDETTI, Acta anat. 37, 370 (1959).

⁷ J. A. YAEGER, Arch. oral Biol. 5, 224 (1961).

⁸ D. A. CAMERON, Clin. Orthopaedics 26, 199 (1963).

⁹ R. M. FRANK, Ann. Histochim. 8, 25 (1963). — R. M. FRANK et J. NALBANDIAN, Adv. fluorine Res. 1, 95 (1963).

¹⁰ A. ASCENZI, C. FRANÇOIS et D. S. BOCCIARELLI, J. Ultrastructure Res. 8, 491 (1963).

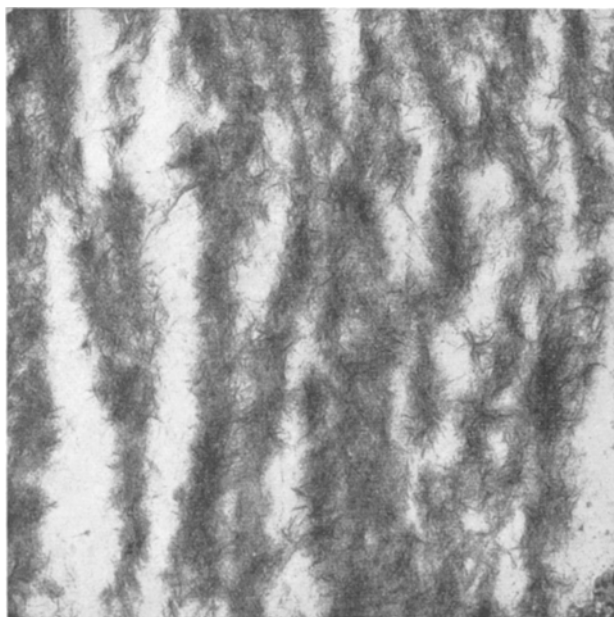


Fig. 1. Cristaux d'apatite déposés irrégulièrement sur des fibrilles collagènes. Coupe parallèle aux fibrilles. Micrographie électronique $\times 28000$.

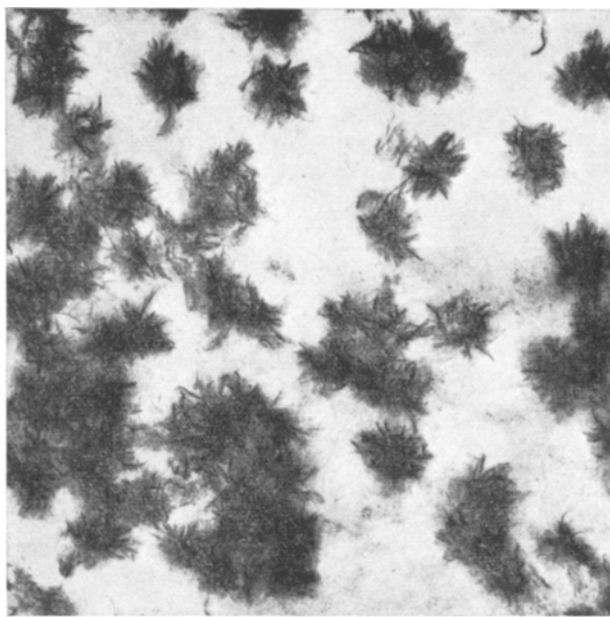


Fig. 2. Cristaux d'apatite déposés irrégulièrement sur des fibrilles collagènes. Coupe perpendiculaire aux fibrilles. Micrographie électronique $\times 28000$.

des cristaux d'apatite débutait dans les fibrilles collagènes et se poursuivait dans la substance fondamentale.

Quant à nos observations sur la condensation de la substance fondamentale, elles sont semblables à celles de YAEGER⁷ et de TAKUMA¹¹, qui concernent l'ossification de membrane et l'os primaire.

Enfin, la constatation par diffraction des rayons X de la nature apatitique des dépôts de substance minérale confirme les résultats obtenus précédemment par SELYE¹².

Summary. In the calcified deposits of the experimental cutaneous calcinosis, the apatite crystals measure ap-

proximately 5 nm in diameter and 50 nm in length; they are associated with the collagen fibrils but without any preferential orientation.

C. A. BAUD et D. H. DUPONT

Institut de Morphologie, Ecole de Médecine, Genève (Suisse), le 15 juillet 1965.

¹¹ S. TAKUMA, Bull. Tokyo dent. Coll. 4, 1 (1963).

¹² H. SELYE, Surg. Clin. N. Am. 43, 1483 (1963).

Formation of a Peculiar Heme-Protein Fraction in Plasmas Containing Hemoglobin¹

In the course of our studies concerning the behaviour of some protein fractions (haptoglobin (Hp), methemalbumin (MetAlb), free hemoglobin (Hb)) in plasma of children (378 plasmas examined) in various physiological and pathological conditions (neonatal jaundice, thalassemia, favism), by means of starch-gel electrophoresis, we have observed in several instances the presence of a particular benzidine-positive band (referred to as 'V') which does not correspond to the above-mentioned fractions. The band is in a more advanced position towards the positive pole as compared to the free Hb band and is closer to the latter when compared to the MetAlb band (Figure).

The presence of the 'V' band appeared closely related to that of free Hb and was found more frequently in the cases without Hp (the difference, however, was not statistically significant: $0.5 > P > 0.3$). Its presence was almost constantly associated with that of the MetAlb band; when the 'V' band was absent, the MetAlb band was prevalently absent too (the difference was statistically significant: $\chi^2 = 48$; $P \leq 0.01$).

Both in full-term and in premature new-born infants presenting free plasma Hb, the 'V' fraction appeared

more frequently in the first few days of life; and in this period it was found more frequently in the premature than in full-term infants (the difference, however, is not statistically significant: $0.5 > P > 0.3$). In nine children with thalassemia major the 'V' band was present only once out of five times with free Hb. In four cases of favism with hemolytic crises, the 'V' band was constantly present up to the fifth or sixth day following the crises.

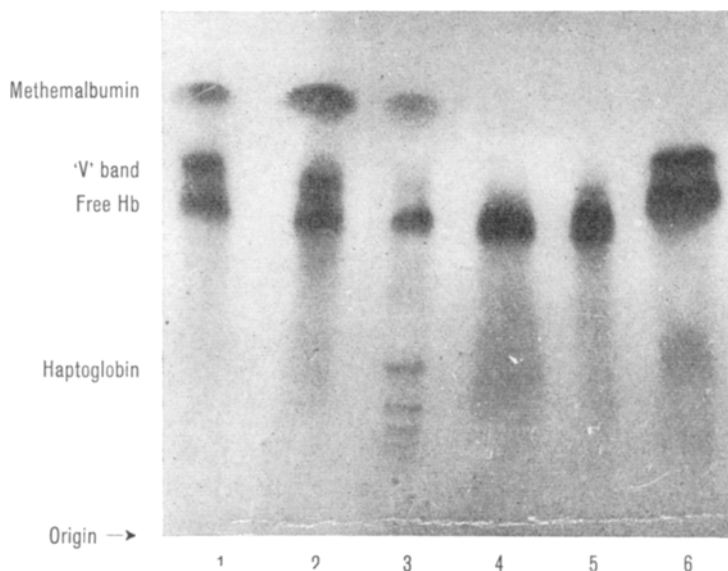
¹ The presence of a fast hemoglobin fraction in the plasma and urine of adults with hemolytic anaemias has recently been reported². A few years ago³⁻⁵ the authors of the present article made analogous observations on the plasma of children with various hemolytic conditions. Their studies, however, were published in Italian and might have been overlooked. Thus it seemed worthwhile to report now in English the relevant data of these investigations together with some additional observations made on the subject during the last few years.

² H. R. MARTI, Exper. 27, 199 (1965).

³ E. BOTTINI, G. FILIPPI, and G. MAGGIONI, Arch. Ital. Ped. Puer. 22, 368 (1962).

⁴ E. BOTTINI, F. COZZI, and G. MAGGIONI, Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 39, 976 (1963).

⁵ E. BOTTINI, F. COZZI, and G. MAGGIONI, Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 39, 979 (1963).



Plasma from 1-day-old premature infant. Starch gel electrophoresis in discontinuous system, stained with benzidine. 1, Plasma of the premature infant before exchange-transfusion. 2, The same plus dithionite. 3, Plasma of the premature infant after exchange-transfusion. 4, Hemolysate from the same premature infant. 5, The same plus dithionite. 6, Hemolysate from normal adult aged 8 days.