

32. Camille FRANÇOIS. (*) — **L'association moléculaire fibres collagènes-cristaux d'apatite et les fonctions biochimiques des cellules osseuses dans les théories actuelles de la calcification.**

Riassunto. — Si descrive la struttura macromolecolare del tropocollagene nei vertebrati e il suo alto grado di organizzazione nella formazione di fibrille. La mineralizzazione del collagene naturale o ricostituito è attribuita a un meccanismo fisico-chimico di nucleazione di cristalli sulla struttura specifica fibrillare delle fibre aventi periodo 640 Å, messe a contatto con un ultrafiltrato di plasma sanguigno.

Si ammette inoltre che i collageni non mineralizzabili siano o circondati da un mezzo non saturo in rapporto alla instabilità dell'idrossiapatite, o protetti da una barriera ionica di mucopolisaccaridi, o costituiti da un collagene differente dal collagene mineralizzabile.

Vengono discusse le obiezioni a questa teoria.

Summary. — The macromolecular structure of the tropocollagen and its highly organized association into fibrils is described. Mineralisation of reconstituted or native collagen in vertebrates is ascribed to a physicochemical mechanism of nucleation of crystals on the specific fibrillar structure of fibers with the 640 Å period, exposed to a plasma ultrafiltrate. It is at the same time admitted that non-mineralisable collagens are: either in an undersaturated medium (referring to the metastability for hydroxylapatite), or protected by an anionic barrier of mucopolysaccharides, or made of a collagen different from the mineralisable collagen. Objections to the physicochemical mechanism are discussed.

La calcification, ou mieux, la minéralisation tissulaire peut être définie comme ceci: c'est le dépôt, sur une matrice organisée des tissus vivants, d'une phase solide minérale qui confère à l'ensemble du système le caractère de rigidité. Ce caractère appartient aux tissus minéralisés que nous appelons os, dents, et aussi à d'autres tissus non minéralisés, comme les phanères rigides de structure kératinique.

Les tissus minéralisés sont très répandus dans la biosphère terrestre. Certaines plantes, certains êtres unicellulaires (radiolaires, diatomées)

(*) Ricercatore aggiunto dell'Istituto interuniversitario belga di scienze nucleari.

ont un squelette cellulaire contenant des sels minéraux. Les arthropodes et les mollusques ont un exosquelette de CaCO_3 , sous plusieurs formes cristallographiques; dans chaque cas, les cristaux apparaissent sur une trame organique particulière.

Nous limiterons notre discussion à la minéralisation chez les vertébrés, car c'est la classe la mieux étudiée. Le tableau 1 résume les diffé-

TABLEAU 1

Classification des tissus minéralisés des vertébrés

Origine embryonnaire	Tissu	Matrice	Minéral
Mésoderme	Cartilage	Coll-MPS	Hydroxyl-apatite
	Os secondaire	Coll _n	»
	Os primaire : embryonnaire folliculine	Coll - X	»
	Calcifications pathologiques	X	»
	Dentine	Coll _n	»
	Cément	Coll _n	»
Ectoderme	Email	Protéine de chaîne β	»
	Coquille d'oeuf	Protéine - MPS	CaCO_3

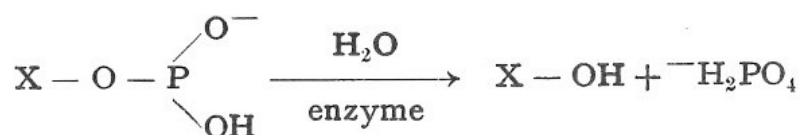
On remarque que le collagène n'est pas la seule substance minéralisable, le sont aussi la protéine de l'émail dentaire ⁽²⁹⁾ et celle de la coquille de l'oeuf ⁽⁴⁾, qui ne sont certainement pas des collagènes.

rents tissus minéralisés présents chez les vertébrés, avec leur trame organique particulière; hormis la coquille des oeufs, le minéral est toujours un phosphate calcique possédant la structure cristalline nommée apatite (réseau hexagonal P6 3/m); la trame organique n'est pas toujours la même: il y a au moins deux structures différentes, actuellement connues, sur lesquelles se dépose du phosphate calcique.

Expliquer la calcification c'est donc expliquer comment, à un

moment du développement de la matrice organique fibreuse de ces tissus. apparaît une phase cristalline. Ensuite, ces cristaux grossissent, jusqu'à remplacer la plus grande partie des espaces interfibrillaires, occupés auparavant par le liquide extracellulaire ⁽⁶¹⁾. Ainsi sont formés, d'une part le squelette, qui nous permet de nous tenir debout, d'autre part l'émail des dents, dont la dureté et l'insolubilité nous permettent de broyer nos aliments.

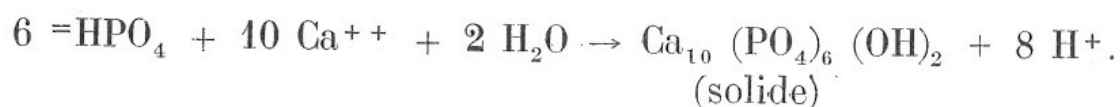
Pendant la période du développement de la biochimie moderne, il était tentant de chercher une explication simple, mais biochimique, au mécanisme de la calcification : l'apport de phosphate devait être lié à la synthèse des molécules organiques riches en phosphate, qui venaient d'être découvertes. Dès 1920, ROBISON ⁽⁵⁶⁾ réalisa des calcifications in vitro en présence de Ca^{++} et de glycérophosphate; il utilisait du cartilage épiphysaire frais de rat rachitique. Il montra aussi que les zones qui se calcifient sont riches en phosphatases alcalines, enzymes qui libèrent de l'orthophosphate à partir de nombreux esters-monophosphates, selon l'équation :



La théorie devint ensuite plus exigeante. En 1932, HARRIS ⁽³⁷⁾ imagina que la calcification devait être liée à la glycogénolyse tout entière. GUTMAN et GUTMAN ⁽³⁵⁾ montrèrent alors, sur le cartilage in vitro, que la calcification est sensible aux inhibiteurs de la glycogénolyse et de l'activité musculaire (fluorure, phlorizine, iodoacetate), autrement dit, que le mécanisme exige le fonctionnement minutieux des systèmes fournisseurs de l'énergie cellulaire. Si, au cours de l'inhibition, on ajoute au système les produits de la réaction bloquée, on restaure la calcification. Cette explication prévalait encore il y a à peine 10 ans ⁽³⁶⁾. En 1954, CARTIER et PICARD ⁽¹⁴⁾ ont produit, in vitro, dans des cartilages épiphysaires d'embryon de mouton, une calcification certaine à l'aide de différents esters-phosphates en présence de Ca^{++} ; la meilleure calcification était obtenue avec l'adénosinetriphosphate (ATP). De plus, le premier sel déposé avait une composition proche de celle du pyrophosphate calcique. Il était donc supposé que l'ATP était scindé par une pyrophosphatase et que le pyrophosphate formé entraînait la minéralisation totale du tissu par l'orthophosphate calcique.

Comme le disaient Dixon et Perkins dans leur revue du sujet en 1956 ⁽¹⁶⁾, le rôle cellulaire direct dans la concentration locale des ions

phosphate et calcium est tout à fait évident; la composition du liquide interstitiel à elle seule ne peut expliquer le dépôt de la phase solide, qui peut s'exprimer par l'équation :



En résumé, une théorie biochimique relativement superficielle, mais soutenue par des constatations expérimentales, semblait donc bien assise.

Pendant la dernière décade, les études de structure des tissus calcifiés ont progressé beaucoup, grâce à la microscopie électronique et aux techniques des coupes fines des tissus calcifiés. La structure des fibrilles collagènes devenait plus claire et les travaux de ROBINSON et WATSON ⁽⁵⁸⁾ avaient mis l'accent sur l'arrangement des cristaux par rapport aux fibres collagènes. C'est à cette particularité, en faveur d'une liaison fibrille collagène-cristaux d'apatite, que se sont attachés de nombreux chercheurs pendant ces dernières années.

1 - STRUCTURE DU COLLAGÈNE

Le collagène est une protéine primordiale; en effet, environ 30% des protéines d'un mammifère sont constituées par du collagène; un homme adulte en contient donc 3,5 Kg, soit 5 fois plus que d'hémoglobine ⁽⁵⁰⁾.

Cette protéine se trouve à peu près uniquement à l'état polymérisé dans l'organisme, autrement dit elle n'existe qu'à l'état de fibre, comme d'ailleurs la myosine et la kératine. Les molécules solubles sont seulement présentes à l'intérieur des cellules qui les synthétisent. On a pu estimer à 200 à 700 µg par ml d'eau cellulaire la quantité maximale, probablement soluble, présente pendant une synthèse rapide dans les fibroblastes ⁽⁴⁶⁾. La polymérisation en fibrilles apparaît déjà sur la face externe de leur membrane cellulaire ⁽⁵⁴⁾: on a pu réaliser des solutions de collagène. Les ions des solutions aqueuses salines, les protons des acides dilués (pH de 3 à 4) font gonfler les fibrilles, entrent en compétition avec les groupes chargés des macromolécules et les libèrent dans le solvant. Le collagène natif, c'est à dire non dénaturé, est cependant extraordinairement peu soluble. En milieu neutre isotonique, à 37°C, une bonne solubilité s'élève à 30 µg/ml, soit 1×10^{-7} M.

Les caractères de l'unité en solution, le tropocollagène, sont assez particuliers ⁽⁷⁾. C'est un bâtonnet fort rigide de 3000 Å sur 13,6, fait de

3 chaînes polypeptidiques enroulées (coiled coil), de poids moléculaire 345.000 dans le cas de l'ichtyocol. La densité atteint la valeur de 1,41 ⁽⁶⁾. Les solutions aqueuses possèdent une haute viscosité intrinsèque (15 dl/g) et une haute rotation spécifique (-400°) ⁽⁷¹⁾, qui rendent compte de la grande asymétrie de la macromolécule. Celle-ci représente déjà un état très ordonné (cristallin), car elle donne un spectre de rayons X aux grands angles: réflexion méridienne de 2,86 Å, qui correspond à la longueur du résidu d'acide aminé le long de l'axe de la macromolécule; cette réflexion est caractéristique des collagènes, les autres protéines fibreuses (kératine, myosine, élastine, fibrine) donnant une réflexion sur une périodicité de 3,3 Å.

Y a-t-il, dans la structure chimique de la chaîne, des caractères en rapport avec les caractères décrits ci-dessus?

La composition en acides aminés est assez particulière. Chez les vertébrés ^(18, 19), un tiers des résidus est composé de glycolle, un tiers est partagé entre les deux acides aminés à noyau pyrrolidine, proline (Pro) et hydroxyproline (Hypro), l'autre tiers étant représenté par un mélange des autres acides aminés. On a pensé longtemps que la présence des acides aminés Pro et Hypro était propre au collagène et, de plus, nécessaire à sa structure. Cependant, Gross et Piez ⁽³⁴⁾ et Watson ⁽⁷²⁾ ont trouvé, dans les collagènes d'invertébrés, un taux très bas en Pro et Hypro, avec une structure secondaire identique à celle des vertébrés, la seule analogie étant un tiers de glycolle.

Les études de séquence ont montré que le glycolle est uniformément réparti dans la majorité des peptides obtenus par scission de la macromolécule ⁽³⁰⁾, et que la suite habituelle est Gly-Pro-Hypro-Gly ou Gly-Pro-X-Gly- (X est quelconque) ^(63, 41, 33). Cette séquence spécifique a été comparée à celle des modèles synthétiques ^(32, 51) quant à leur sensibilité aux enzymes protéolytiques. Les deux groupes résistent à la trypsine ⁽⁴⁴⁾, mais sont sensibles à une collagénase ⁽¹⁵⁾. Le collagène est également résistant à la chymotrypsine. La base de la structure est donc la présence de Gly à chaque troisième position dans la chaîne polypeptidique. C'est de plus la seule exigence au modèle de Rich et Crick ⁽⁵⁵⁾.

Ces macromolécules sont associées en fibrilles *in vivo*; elles sont liées l'une à l'autre latéralement et bout à bout par leurs groupes polaires et par des liaisons hydrogènes. L'édifice ainsi constitué est extrêmement résistant à la traction, mais, par contre, très sensible aux électrolytes et à la température. Vers 50°C, les fibres hydratées se contractent, subissent une transition de phase, analogue à une fusion cristalline ⁽²⁴⁾; dans cet état, la tendance à la dénaturation irréversible est élevée. En solution, les macromolécules sont encore beaucoup plus sensibles à la

température, et sont en cela comparables aux enzymes. Leurs solutions aqueuses subissent des remaniements profonds: la viscosité intrinsèque d'un collagène de poisson, par exemple, tombe de 13 dl/g à 0,5 dl/g en quelques minutes, à 14°C (⁷⁴, ⁷¹). Cette dénaturation aux basses températures n'est pas une dénaturation au sens propre, c'est une transition réversible, comme l'avaient suggéré ROBINSON et BOTT (⁵⁷). Les études physico-chimiques de cette transition collagène $\rightleftharpoons$ gélatine froide font apparaître que de telles gélatines ont parfois un poids moléculaire supérieur à celui du collagène dont elles proviennent, et cela suggère l'existence dans ces molécules de liaisons intratropocollagènes, de force assez proche de celle des liaisons peptidiques (²⁵, ⁷¹). A température plus élevée, vers 50°-60°C, on réalise en solution une véritable dénaturation, avec effondrement et rupture de la macromolécule en 3 fragments à structure anarchique (⁷). Ce sont les gélatines habituelles, qui ne peuvent plus reformer ni le tropocollagène, ni les fibrilles natives.

Depuis les travaux de NAGEOTTE (⁴⁸), ceux de HIGHBERGER (³⁸) et ceux de VANAMEE et PORTER (⁷⁰), on connaît la réversibilité de la transition: fibrilles $\rightleftharpoons$ solution. C'est à SCHMITT (⁶²) que revient le mérite d'avoir montré le rapport entre l'unité soluble, appelée tropocollagène, et ses différentes espèces d'association en fibrilles; chaque espèce est transformable en n'importe laquelle des autres, pour autant que l'on passe d'abord par la phase solution. La forme rencontrée in vivo est presque toujours celle qui possède la périodicité de 640 Å. L'image au microscope électronique est connue depuis longtemps. La période est à peu près le 1/4 de la longueur de la macromolécule; les molécules sont accolées avec orientation dans une seule direction, et avec un décalage de 1/4 de longueur par rapport à la voisine. La macromolécule est donc 4 fois plus longue que la période de l'image au microscope électronique. Celle-ci est propre à ces fibrilles; l'image est le reflet d'une structure chimique réelle: il y a une concentration électronique, due à des groupes polaires, non encore spécifiés; en effet, le contraste obtenu avec les métaux lourds existe aussi dans la protéine fibreuse pure; c'est la preuve d'une densité électronique plus élevée dans les bandes sombres. Une autre preuve est la réflexion sur un réseau à périodicité de 640 Å - 700 Å obtenue par la diffraction des rayons X aux bas angles, sur les fibres natives, non contrastées (⁵).

2 - NUCLÉATION DE L'APATITE PAR LES FIBRILLES

En 1957, SOBEL et BURGER (⁶⁶) et STRATES et coll. (⁶⁸) sont parvenus à minéraliser les fibres collagènes dans une solution contenant des ions Ca^{++} et PO_4^{3-} . Cette solution, assez diluée, ne donne jamais de précipité,

si l'on n'y ajoute pas de fibres collagènes; elle reste stable indéfiniment, ou plutôt elle est dans un équilibre appelé métastable. L'équilibre entre un solide et une solution de ses ions peut être représenté par l'équation $[B^-] \times [A^+] = P$, où P exprime le produit ionique; il est constant à température déterminée et en présence de la phase solide. Cependant, en

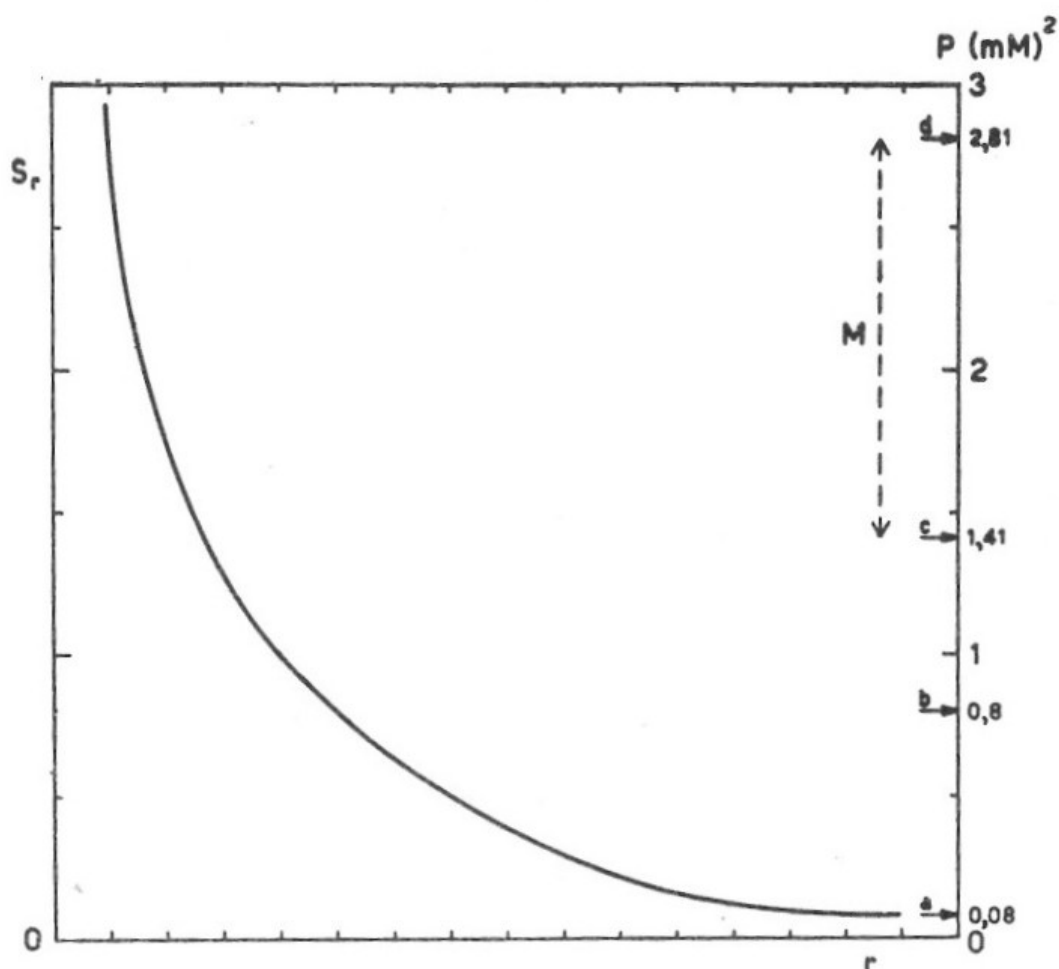


Fig. 1. - Solubilité S_r d'un solide en fonction de la grosseur r de ses cristaux d'après ⁽¹⁰⁾. A droite, l'ordonnée construite d'après les chiffres de la littérature ^(22, 23, 69) indique le produit ionique, à 37°C et à force ionique 0,16, pour :

- a) une solution en présence d'hydroxylapatite pure à gros cristaux;
- b) une solution en équilibre avec le tissu osseux compact;
- c) un ultrafiltrat de sérum sanguin;
- d) les solutions les plus concentrées, employées pour la minéralisation in vitro du collagène.

l'absence de phase solide, on peut augmenter la concentration d'un ou des deux ions de telle façon que le produit ionique dépasse P , défini pour une température donnée, sans obtenir de précipitation. C'est le cas bien connu des solutions sursaturées. On peut ainsi quadrupler le produit $[Ca^{++}] \times [HPO_4] = 0,8 \cdot 10^{-7} M^2$, sans précipiter l'hydroxylapatite. On peut l'expliquer de la façon suivante; il existe une condition rarement exprimée à la constance de P : c'est la grosseur des cristaux de la phase solide en équilibre avec la solution; la solubilité diminue

avec le grossissement des cristaux de la phase solide. La fonction a la forme de la figure 1. Nous y avons joint l'ordonnée P, pour l'hydroxylapatite calcique à 37°C et force ionique 0,16. On peut quadrupler P sans obtenir la précipitation, pourvu que la solution soit la seule phase présente, et que l'on en ait exclu toute poussière, en la filtrant sur un filtre à micropores. La sursaturation disparaît si on ajoute un germe, qui est une phase solide des mêmes ions, ou bien un solide étranger à réseau très proche.

Les recalcifications ont été obtenues avec des produits ioniques de valeur située dans la zone M (fig. 1); les fibres collagènes agissent donc comme un germe cristallin; elles provoquent un phénomène analogue à une concentration ionique en un point; celle-ci permet de franchir la barrière d'énergie libre à surmonter pour former la phase solide.

Cette théorie de la nucléation de l'apatite sur la fibrille collagène a pris toute sa signification depuis les travaux de GLIMCHER et coll. (²⁷, ²⁸). Ces auteurs ont démontré la spécificité de la fibrille native; parmi les espèces d'association de macromolécules en les différentes fibrilles décrites par SCHMITT (⁶²), seule la fibrille de 640 Å de période, native ou reconstituée (peau, tendon, os), se reminéralise dans les solutions métastables; les macromolécules en solution ne se reminéralisent pas. Cette propriété dépend seulement de l'arrangement stérique des macromolécules associées en fibrilles de 640 Å, et pas de propriétés particulières aux macromolécules et apparues éventuellement pendant l'aggrégation en fibrilles. La nucléation est donc liée à un arrangement stérique de groupes organiques; les noyaux cristallins formés ont une disposition périodique, dans la bande sombre, et il y a probablement un seul noyau par bande de fibrille.

Après cette nucléation, le processus physique de grossissement cristallin se déroule automatiquement, avec apport des ions du sang, par simple diffusion. Les cristaux prennent alors l'aspect d'aiguilles denses, avec leur axe cristallographique c parallèle aux fibrilles, et qui donnent l'image maintenant classique de l'os compact.

Ce mécanisme est-il fonctionnel in vivo? Le produit ionique des ions en jeu dans le sérum est situé aux environs de 1,4 (mmole/litre)². On ignore encore les conditions qui règnent aux environs de l'ostéoblaste. On a tenté, par exemple, de greffer du tendon ou des fibrilles reconstituées dans la cavité péritonéale; les fibrilles se minéralisent après 16 jours, le tendon après beaucoup plus de temps (⁴⁷). Cette seule expérience ne permet pas de conclure sur la réalité du processus de nucléation in vivo, car il faudrait connaître beaucoup mieux les conditions ioniques et le métabolisme de toutes les substances constituant la trame; pourquoi, en effet, le tendon greffé se minéralise-t-il?

3 - HYPOTHÈSE DE L'INHIBITION DE LA NUCLÉATION

La peau, le tendon, ces tissus eux-mêmes qui ont servi à préparer les fibrilles calcifiables ne se calcifient habituellement pas *in vivo*. Il faut donc imaginer dans ces tissus un mécanisme d'inhibition, parmi les mécanismes possibles que nous classons en trois groupes :

a) les ions minéraux Ca^{++} ou $\equiv\text{PO}_4$, où les deux ont une concentration abaissée au niveau de la fibrille collagène;

b) l'accès des ions minéraux aux groupes spécifiques du collagène n'est pas libre;

c) les propriétés nucléatrices du collagène sont absentes.

a) On pourrait penser que, dans les tissus mous, les fibroblastes ou les cellules vasculaires voisines réalisent un abaissement d'une ou des concentrations ioniques, par le jeu d'une sorte de pompe ionique cellulaire, analogue à celle qui existe pour le sodium. Un mécanisme pareil n'expliquerait-il pas l'absence de minéralisation de la trame préosseuse du rachitisme? Il suffit en effet d'élever la concentration en $\equiv\text{PO}_4$ *in vivo*, ou *in vitro*, pour produire la nucléation des cristallites ⁽⁶⁰⁾.

b) Pourrait-on, d'autre part, expliquer un arrêt de diffusion des ions au site spécifique du collagène? C'est probablement l'explication la plus tentante à l'heure actuelle, car elle est en accord avec beaucoup de faits. Dans l'os compact ⁽¹⁸⁾, 94% des matières organiques sont représentées par le collagène; dans le tendon, 76%, dans la peau, 63%, dans la cornée, 51% ⁽⁶⁵⁾; 84% dans la peau de la morue, moins de 50% dans le cartilage hyalin ⁽¹⁷⁾. Il est donc évident que le tissu osseux est le plus pur des tissus fibreux à collagène, et ce fait est rarement reconnu. Il faut en rapprocher trois faits: le cartilage qui s'ossifie perd ses mucopolysaccharides au cours de cette minéralisation ⁽¹⁷⁾; dans les calcifications pathologiques, le dépôt du minéral semble s'accompagner d'une perte de mucopolysaccharides, qui sont dans certains cas remplacés par des protéines. Il semble donc que des lésions, des dégénérescences tissulaires, et aussi le vieillissement, causent la perte de ces substances interfibrillaires, plus métaboliques d'ailleurs que le collagène ⁽⁸⁾, et mettent à nu les fibrilles collagènes ⁽³⁹⁾; enfin, la théorie de la nucléation a été montrée avec des fibres reconstituées à partir de collagène de tissu non minéralisé. Est-ce donc la purification de ce collagène qui en sépare les substances inhibitrices de la minéralisation? Cela semble très possible. Ces mucopolysaccharides et ces mucoprotéines sont des polymères,

respectivement de carbohydrates et dérivés, et de ces derniers couplés à une partie protéinique. Les chondroitinesulphates par exemple sont actuellement considérés comme de grosses molécules, non pas libres, mais liées à des protéines (⁴⁰, ¹¹) par des liaisons non encore connues, mais assez labiles; l'ensemble réalise d'immenses macromolécules, dont la viscosité pour le cartilage, par exemple, est infiniment grande (²⁰). Ces macromolécules peuvent-elles servir de barrière aux ions? Probablement, car ce sont des macromolécules très chargées; elles portent des groupes —COO^- et —SO_3^- ; nous pouvons imaginer pourquoi le cartilage fixe tant de calcium in vitro (⁹), et pourquoi il en contient aussi beaucoup in vivo; sa trame de chondromucoprotéine a un haut pouvoir de complexation; la constante de complexation du chondroitinesulphate A pour le calcium a été estimée à 15 (¹²). Ce polyélectrolyte chargé pourrait donc, soit annuler l'activité ionique, autrement dit la liberté de l'ion calcium, soit empêcher, par sa charge négative, la diffusion des ions HPO_4^- .

c) Le collagène non minéralisé diffère de l'autre dans sa structure, malgré la similitude au microscope électronique et à la diffraction des rayons X; la composition en aminoacide est identique pour les deux (¹⁹), à l'exception d'une différence dans le rapport lysine/hydroxylysine (⁵²), laquelle n'est pas en relation avec la faculté de minéralisation (⁴⁵) in vivo. La plupart des collagènes purifiés contiennent 0,7% d'hexose (³¹). Il est possible que la structure primaire diffère par d'autres constituants mineurs, non encore découverts, ou dans la séquence d'une partie de la chaîne moléculaire.

Nous savons que la composition et la séquence ne définissent pas à elles seules les propriétés d'une protéine; ainsi on a pu fractionner (²¹) certaines solutions de collagène natif selon leur capacité à reformer des fibrilles; les fractions ont cependant la même composition, les mêmes propriétés physiques en solution, et donnent les mêmes fibrilles. Elles doivent différer entre elles seulement par des particularités mineures de la structure secondaire ou tertiaire. Il faut en rapprocher des composants encore peu connus: polypeptides et aminoacides liés solidement aux macromolécules de tropocollagène, et accompagnant celles-ci au cours des purifications (⁶⁷); elles en sont séparables par des fractionnements dans les solvants comme le mélange acétone-eau légèrement acide ou basique.

Comment de minimes différences peuvent-elles jouer un rôle si important? La nucléation de l'apatite est due probablement à l'intervention simultanée des groupes polaires des fibrilles à disposition stérique, lesquels réalisent, par attraction, la concentration ionique nécessaire à

l'apparition des premiers cristallites. Aussi a-t-on cherché à supprimer certains groupes polaires des fibrilles minéralisables. GLIMCHER ⁽²⁸⁾ a montré que le degré de minéralisation diminue au fur et à mesure que l'on bloque un plus grand nombre de groupes —NH_3^+ (lysine et hydroxyllysine), sans changer la structure de la fibrille. Sans groupes —NH_3^+ , il n'y a donc pas de minéralisation, ce qui indique que ce groupe intervient dans l'attraction des ions négatifs. Dans leur recherche récente, KRANE et GLIMCHER ⁽⁴²⁾ ont pu mettre en évidence une réactivité particulière des fibrilles de 640 Å de période. Ces fibrilles sont phosphorylées par l'ATP en présence de Mg^{++} , ou encore par =HPO_4 . Le collagène dans cet état d'aggrégation a une activité kinasique pour l'ATP, et il est en même temps enzyme et substrat dans cette réaction. Il se forme dans ces deux réactions 1 à 5 liaisons ester-phosphate par mole de collagène. Ces dernières expériences indiquent donc une activité spécifique du collagène (fibrilles de 640 Å) pour l'orthophosphate. L'interaction semble d'ailleurs inhibée compétitivement par les esters-phosphates, comme l'indique le travail de FLEISCH et NEUMAN ⁽²²⁾. Le groupe du collagène qui réagit n'est pas encore connu; mais il est possible que ce soit un groupe aminé libre, comme l'avaient proposé POLONOVSKY et coll. en 1951 ⁽⁵³⁾.

En résumé, les mécanismes les plus probables à l'heure actuelle sont les suivants: le collagène des tissus calcifiables a une affinité pour l'orthophosphate; les groupes actifs, polaires ou autres, réalisent en présence d'ions Ca^{++} et =PO_4 , et peut-être après activation par formation de liaisons covalentes esters-phosphates, la nucléation de l'apatite au sein ou à la surface des fibrilles. Le processus est inhibé dans les autres tissus, mais nous ignorons encore par quel mécanisme.

4 - OBJECTIONS

Il existe des cas de minéralisations difficilement explicables par ce mécanisme.

Les calcifications pathologiques, par exemple, apparaissent dans toute espèce de tissu lésé; la plupart sont constituées d'hydroxylapatite, mais celle-ci se dépose très rarement sur des structures collagènes; elle apparaît sur des structures intra-ou extracellulaires, comme l'élastine de la paroi artérielle. On n'a pas encore pu mettre le caractère minéralisable de ces structures en rapport avec d'autres de leurs propriétés. Il existe aussi d'autres tissus que nous comprenons mal: dans le cartilage épiphysaire, la nucléation de l'apatite se produit sur des fibrilles très ténues et non périodiques ⁽⁵⁹⁾, ou sur des fibrilles à période de 200 Å ⁽²⁶⁾;

les auteurs pensent même que les cristaux apparaissent entre les fibrilles, sans rapport avec celles-ci. L'os primaire est un os à fibres collagènes assez rares, fines et orientées en tous sens; entre les fibrilles, il y a une matrice amorphe, non encore caractérisée au point de vue chimique; ASCENZI et BENEDETTI ⁽¹⁾ y ont trouvé une minéralisation en petits amas cristallins, à la fois sur les fibrilles et en dehors des fibrilles. Récemment, ASCENZI et coll. ⁽³⁾ ont étudié un autre os à structure primaire; il contient des amas denses de cristaux d'apatite, assez peu orientés, localisés sur une matrice apparemment non fibreuse. A côté de ces dépôts, il existe des fibrilles collagènes normales au microscope électronique, qui ne sont pas du tout en rapport avec les cristaux. Il existe donc, dans ce tissu normal, une matrice minéralisable qui n'est pas la matrice habituelle, et, mélangée à celle-ci, une matrice de fibres collagènes normales non minéralisées. Il est à peu près certain que ces deux matrices ont été fabriquées par la même cellule; la minéralisation spécifique ne peut alors se comprendre qu'en imaginant, soit une concentration ionique variable en des points voisins de la même cellule, soit la synthèse par une cellule de deux espèces différentes de collagène, ou d'un collagène pur et d'un collagène protégé par des mucopolysaccharides. Ainsi pareil tissu nous oblige à invoquer, dans le processus de la calcification, non seulement l'activité cellulaire, mais aussi l'activité polyvalente d'une même cellule.

Ces cellules osseuses ont-elle des caractères biochimiques propres? On a fait déjà de longues recherches sur le métabolisme glucidique et les systèmes fournisseurs d'énergie; mais il semble qu'on ne puisse pas y découvrir un caractère propre à l'ostéoblaste ou à l'ostéoclaste. Les théories de la fourniture de phosphate à partir des esters-phosphates nous paraissent très peu utiles à un mécanisme physico-chimique; l'ostéoblaste a un rôle primordial à jouer dans la synthèse d'un collagène minéralisable; cette synthèse est encore fort mal connue et il nous manque les études comparées, chez le fibroblaste et l'ostéoblaste, de la synthèse de collagène et des mucopolysaccharides.

5 - CONCLUSION

Nous rappellerons pour terminer que la théorie de la nucléation nous paraît un corollaire important à l'idée de l'existence d'une liaison collagène-cristaux; il existe des arguments en faveur de celle-ci: les études aux infra-rouges ⁽¹³⁾ et celles de biréfringence optique ⁽²⁾, qui montrent que les propriétés des deux constituants ne sont pas additives; la stabilisation des fibrilles par l'apatite ⁽⁴²⁾: l'activité ATP asique est

conservée jusqu'à 100°C, alors que les fibrilles décalcifiées sont déjà transformées en gélatine à 50°C; pour la structure tertiaire des fibrilles, l'apatite joue donc le rôle des tannins qui stabilisent les fibrilles jusqu'aux environs de 95°C⁽⁴³⁾. L'os est une structure des plus résistantes, car après mille siècles de séjour dans le sol, il contient encore des fibrilles collagènes⁽⁶⁴⁾; cette grande inertie est à comparer à son renouvellement in vivo: sa demi-vie y est seulement de quelques semaines⁽⁵⁰⁾.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Fisica.

BIBLIOGRAPHIE

- (¹) A. ASCENZI et E. L. BENEDETTI - Rend. Ist. sup. Sanità, 19: 470 (1956).
- (²) A. ASCENZI et E. BONUCCI - Acta anat., 44: 236 (1961).
- (³) A. ASCENZI, C. FRANÇOIS et D. STEVE BOCCIARELLI - Suppl. Nuovo Cimento (sous presse).
- (⁴) J. R. BAKER et D. A. BALCH - Biochem. J., 82: 352 (1962).
- (⁵) R. S. BEAR - Adv. Protein Chem., 7: 69 (1952).
- (⁶) R. S. BEAR - in The Fibrous Proteins and Their Biological Significance - Cambridge Univ. Press (1955).
- (⁷) H. BOEDTKER et P. DOTY - J. am. chem. Soc., 78: 4267 (1956).
- (⁸) H. BOSTRÖM et S. GARDELL - Acta chem. scand., 7: 1014 (1953).
- (⁹) E. S. BOYD et W. F. NEUMAN - J. biol. Chem., 193: 243 (1951).
- (¹⁰) H. E. BUCKLEY - Crystal growth, John Wiley ed., New York (1951).
- (¹¹) E. BUDDECKE et M. SCHUBERT - Z. physiol. Chem., 325: 189 (1961).
- (¹²) E. BUDDECKE et R. DRZENICK - Z. physiol. Chem., 327: 49 (1962).
- (¹³) V. CAGLIOTI, A. ASCENZI et M. SCROCCO - Experientia, 10: 371 (1954).
- (¹⁴) P. CARTIER et J. PICARD - Bull. Soc. Chim. biol., 37: 1159 (1955).
- (¹⁵) R. DE BELLIS, I. MANDEL et J. D. MACLENNAN - Nature, 174: 1191 (1954).
- (¹⁶) T. F. DIXON et H. R. PERKINS - in G. H. Bourne, The Biochemistry and Physiology of Bone - Academic Press (1956).
- (¹⁷) H. J. DULCE - Z. physiol. Chem., 319: 257 (1960).
- (¹⁸) J. E. EASTOE - Biochem. J., 57: 453 (1954).
- (¹⁹) J. E. EASTOE et A. A. LEACH - Rec. Adv. in Gelatine and Glue Res. - Pergamon Press, London (1958).
- (²⁰) J. H. FESSLER - Biochem. J., 76: 124 (1960).
- (²¹) J. H. FESSLER - Biochem. J., 76: 452 (1960).
- (²²) H. FLEISCH et W. F. NEUMAN - J. am. chem. Soc., 82: 3783 (1960).
- (²³) H. FLEISCH - Schweiz. med. Wschr., 91: 858 (1961).
- (²⁴) P. J. FLORY et R. R. GARRETT - J. am. chem. Soc., 80: 4836 (1958).
- (²⁵) P. J. FLORY et E. S. WEAVER - J. am. chem. Soc., 82: 4518 (1961).
- (²⁶) R. H. FOLLIS et A. J. TOUSIMIS - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 98: 843 (1958).
- (²⁷) M. J. GLIMCHER, A. J. HODGE et F. O. SCHMITT - Proc. nat. Acad. Sci., 43: 860 (1957).
- (²⁸) M. J. GLIMCHER - in Calcification in Biological Systems, p. 421, Amer. Assoc. Advanc. Science, Washington (1960).
- (²⁹) M. J. GLIMCHER, G. MECHANIC, L. C. BONAR et E. J. DANIEL - J. biol. Chem., 236: 3210 (1961).
- (³⁰) W. GRASSMANN, K. HANNIG, H. ENDRES et A. RIEDEL - Z. physiol. Chem., 306: 123 (1956).
- (³¹) W. GRASSMANN, U. HOFMANN, H. KUHN, H. ENDRES et K. WOLF - in Connective Tissues, R. E. Turnbridge editor, Blackwell (1958).
- (³²) W. GRASSMANN, H. HÖRMAN, A. NORDWIG et E. WÜNSCH - Z. physiol. Chem., 316: 287 (1959).

- (33) W. GRASSMANN, K. HANNIG et M. SCHLEYER - *Z. physiol. Chem.*, 322: 71 (1960).
- (34) G. GROSS et K. A. PIEZ - in *Calcification in Biological Systems*, R. F. Sognnaes, Amer. Assoc. Advanc. Sci., Washington (1960).
- (35) A. B. GUTMAN et E. B. GUTMAN - *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 48: 687 (1944).
- (36) A. B. GUTMAN et T. F. YU - *Metabolic Interrelations*, Trans. Ist. Conf. Josiah Macy Jr. Foundation, New York (1950).
- (37) H. A. HARRIS - *Nature*, 130: 996 (1932).
- (38) J. T. HIGHBERGER, J. GROSS et F. O. SCHMITT - *Proc. nat. Acad. Sci.*, 40: 679 (1954).
- (39) C. HIRSCH, S. PAULSON, B. SYLVEN et O. SNELLMAN - *Acta orthop. scand.*, 22: 175 (1953).
- (40) J. KÖHLER et M. SCHWABE - *Z. Naturforschung*, 16 b: 492 (1961).
- (41) T. D. KRONER, W. TABROFF et J. J. Mc GARR - *J. am. chem. Soc.*, 77: 3356 (1955).
- (42) S. M. KRANE et M. J. GLIMCHER - in *Radioisotopes and bone*, P. Lacroix et A. M. Budy ed., Blackwell Scient. Public., Oxford, England (1962) pag. 449.
- (43) K. KÜHN et E. GEBHART - *Z. Naturforsch.*, 15 b: 23 (1960).
- (44) K. KÜHN, J. KÜHN et K. HANNIG - *Z. physiol. Chem.*, 326: 50 (1961).
- (45) R. C. LIKINS, K. A. PIEZ et M. L. KUNDE - in *Calcification in Biological Systems*, R. F. Sognnaes, Amer. Assoc. Adv. Sci., Washington (1960).
- (46) D. A. LOWTHER, N. M. GREEN et J. A. CHAPMAN - *J. biophys. biochem. Cytol.*, 10: 373 (1961).
- (47) S. E. MORGENHAGEN - *Biochim. biophys. Acta*, 43: 563 (1960).
- (48) J. C. NAGEOTTE - *C. R. Soc. Biol.*, 96: 828 (1927).
- (49) A. NEUBERGER - *Exp. Ann. Biochim. med.*, 16: 67 (1934).
- (50) A. NEUBERGER - in *The Fibrous Proteins and Their Biological Significance*, Cambridge Univ. Press (1955).
- (51) A. NORDWIG - *Das Leder*, 13: 10 (1962).
- (52) K. A. PIEZ et R. C. LIKINS - in *Calcification in Biological Systems*, R. F. Sognnaes, Amer. Assoc. Adv. Sci., Washington (1960).
- (53) M. POLONOVSKY et P. CARTIER - *C. R. Acad. Science, Paris*, 232: 449 (1951).
- (54) K. R. PORTER et G. D. PAPPAS - *J. biophys. biochem. Cytol.*, 5: 453 (1959).
- (55) A. RICH et F. H. C. CRICK - *J. molec. Biol.*, 3: 483 (1961).
- (56) R. ROBISON - *The Significance of Phosphorus Esters Metabolism*, New York, Univ. Press (1932).
- (57) C. ROBINSON et M. J. BOTT - *Nature*, 168: 325 (1951).
- (58) R. A. ROBINSON et M. L. WATSON - *Anat. Record*, 114: 383 (1952).
- (59) R. A. ROBINSON et D. A. CAMERON - *J. biophys. biochem. Cytol.* 2 supp, 253 (1956).
- (60) R. A. ROBINSON et H. SHELDON - in *Calcification in Biological Systems*, R. F. Sognnaes, Amer. Assoc. Adv. Sci., Washington (1960).
- (61) R. A. ROBINSON - *Clin. Orthoped.*, 17: 437 (1960).
- (62) F. O. SCHMITT - *Proc. am. phil. Soc.*, 100: 476 (1956).
- (63) W. A. SCHROEDER, L. M. KAY, J. LEGETTE, L. HONNEN et F. C. GREEN - *J. am. chem. Soc.*, 76: 3556 (1954).
- (64) F. M. SINEX et B. FARIS - *Science*, 129: 969 (1959).
- (65) G. SMITS, J. MORREAU et C. GARCIA-SMIT - *Biochim. biophys. Acta*, 25: 542 (1957).
- (66) A. E. SOBEL et M. BURGER - *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 87: 7 (1954).
- (67) F. S. STEVEN et G. R. TRISTRAM - *Biochem. J.* 83: 240 (1962).
- (68) B. S. STRATES, W. F. NEUMAN et G. J. LEVINSKAS - *J. phys. Chem.*, 61: 279 (1957).
- (69) G. M. VAES et G. NICHOLS Jr. - *Endocrinol.*, 70: 546 (1962).
- (70) P. VANAMEE et K. R. PORTER - *J. exp. Med.*, 94: 255 (1951).
- (71) A. VEIS, J. ANESEY et J. COHEN - *Arch. Biochem. Biophys.*, 94: 20 (1961).
- (72) M. R. WATSON - in *Recent Adv. Gelatine and Glue Res.*, Pergamon Press London (1958).
- (73) E. G. YOUNG et J. W. LORIMER - *Arch. Biochem. Biophys.*, 83: 373 (1960).
- (74) E. G. YOUNG et J. W. LORIMER - *Arch. Biochem. Biophys.*, 92: 483 (1961).