

ÉTUDE CHEZ LE RAT D'UNE CALCINOSE CUTANÉE INDUITE PAR CALCIPHYLAXIE LOCALE

II. — ASPECTS BIOPHYSIQUES DE LA SUBSTANCE MINÉRALE

G. BOIVIN et H. J. TOCHON-DANGUY
avec la collaboration technique de Christiane DEMEURISSE

*Institut de Morphologie,
École de Médecine,
1211 Genève 4 Suisse*

RÉSUMÉ

La substance minérale des calcinoses cutanées induites chez le rat par calciphyllaxie locale (stades 18 heures à 65 jours), est analysée par diffraction électronique, diffraction des rayons X et spectroscopie infrarouge.

Les résultats ainsi obtenus : 1) mettent en évidence la présence de deux phases (amorphe et cristalline) de phosphate de calcium dans la substance minérale des calcinoses ; 2) définissent la nature apatitique de la phase cristalline et montrent l'accroissement de la taille des cristaux du dépôt minéral calciphyllactique et ce jusqu'à une valeur comparable à celle des cristaux du dépôt minéral osseux ; 3) révèlent une forte augmentation (des stades 18 heures à 15 jours) puis la stabilisation (des stades 15 à 65 jours) du pourcentage de minéral cristallin au cours du développement de la calcinose ; 4) permettent de comparer cette évolution avec celle observée pour la substance minérale osseuse des rats traités et de discuter la différence significative obtenue entre les valeurs moyennes des pourcentages de minéral cristallin de la calcinose et du tissu osseux aux stades 15 à 65 jours.

Nos résultats sont discutés en les comparant aux quelques données biophysiques déjà acquises au cours de l'étude de calcifications expérimentales ou pathologiques et du tissu osseux normal.

INTRODUCTION

La mise au point de modèles expérimentaux facilite l'approche des mécanismes des minéralisations biologiques. Ainsi les calcinoses cutanées provoquées par calciphyllaxie locale (SELYE, 1962) permettent d'étudier la calcification des tissus conjonctifs.

Seuls quelques auteurs ont relaté des observations par diffraction électronique et/ou par diffraction des rayons X sur la substance minérale des calcinoses cutanées (MOSS et URIST, 1964 ; COUSINS et SMILLIE, 1965 ; BAUD et DUPONT, 1966 ; SCHIBLER et FLEISCH, 1966 ; GABBIANI *et al.*, 1969 ; BAUD et BADONNEL, 1970 ; PEARCE *et al.*, 1972). Sur des calciphylaxies « déclenchées » mécaniquement ou chimiquement, et à des stades égaux ou supérieurs à 24 heures, ces auteurs décèlent dans le dépôt inorganique, une phase importante de nature apatitique ainsi que la présence d'une phase minérale peu ou pas cristallisée. D'autre part, les réponses calciphylactiques n'ont pas encore été analysées par spectroscopie infrarouge.

Vu le peu de données biophysiques concernant la substance minérale des calcinoses cutanées induites expérimentalement par calciphylaxie locale et après avoir étudié les aspects ultrastructuraux des phases initiales de ce phénomène (BOIVIN, 1974, 1975), il nous a semblé intéressant d'approfondir l'examen biophysique commencé sur des stades inférieurs ou égaux à 8 jours (BOIVIN, 1974) et de l'étendre à certains stades plus âgés. Le but du présent article est de relater les résultats obtenus :

par diffraction électronique et diffraction des rayons X afin de définir la nature et certaines caractéristiques de la substance minérale ;

par spectroscopie infrarouge pour préciser la nature du dépôt inorganique et analyser les proportions de substance minérale amorphe ou cristalline dans les calcinoses.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Des rats blancs femelles âgés de 4 semaines ont été utilisés au cours de cette étude basée sur l'observation de calciphylaxies locales (SELYE, 1962). Le protocole employé pour l'obtention des calciphylaxies a déjà été décrit en détails (BOIVIN, 1974, 1975) et nous n'en rappellerons que les grandes lignes. Les animaux sont « sensibilisés » par une intubation gastrique de dihydrotachystérol (DHT ; 1 mg pour 100 g de poids corporel) en solution huileuse (Calcamine, Wander, Berne) et, 24 heures plus tard, la réaction calciphylactique est « déclenchée » par l'injection sous-cutanée de Fe Cl_2 (50 μg pour 100 g de poids corporel). Les prélèvements de tissu conjonctif sous-cutané minéralisé sont réalisés sur les animaux vivants, sous anesthésie profonde, et sont effectués : 18, 24, 48 heures, 4, 8, 15, 16, 20, 30, 34, 40 et 65 jours après le « déclenchement ». Par ailleurs, dans les mêmes conditions et aux mêmes stades, les moitiés proximales des diaphyses fémorales sont prélevées pour des analyses par spectroscopie infra-rouge.

Diffraction des rayons X

Une partie des plaques calciphylactiques est fixée puis conservée dans l'alcool absolu. L'analyse par diffraction des rayons X est réalisée sur des fragments de ces échantillons, à l'aide d'une caméra de Chesley munie d'un collimateur de 100 μm permettant de sélectionner la zone à étudier. Celle-ci est soumise au rayonnement $K\alpha$ du cuivre filtré par le nickel, sous 40 kV et 24 mA ; le temps d'exposition est d'environ 12 heures. Des tracés des diagrammes obtenus sont réalisés avec un microdensitomètre Joyce Loebel et sont comparés à celui d'une poudre de tissu osseux de rat témoin. Les mesures du diamètre des anneaux de diffraction et de leur largeur à demi-intensité (indice β), renseignent sur la nature et la taille des cristaux du dépôt minéral.

Diffraction électronique

Une autre partie des plaques calciphylactiques est fixée, incluse et coupée pour la microscopie électronique selon les méthodes déjà décrites (BOIVIN, 1975). Les diagrammes de diffraction électronique sont réalisés avec un microscope Philips EM 75 muni d'une unité de diffraction à haute

résolution. L'analyse s'effectue sur des surfaces limitées (1 μm de diamètre) et sous une tension de 60 kV. L'étalonnage préalable, pour la détermination des distances réticulaires (valeurs de d), est obtenu par diffraction de cristaux d'or.

Spectroscopie infrarouge

Dès leur prélèvement, les fragments de la plaque calciphylactique ainsi que les fragments des diaphyses fémorales sont rapidement nettoyés puis dégraissés 20 minutes dans une solution alcool/trichloréthylène (1/1). Ils sont ensuite réduits en fine poudre, à froid dans un broyeur à bille (Spex), puis cette poudre est séchée à l'étuve à 40°C et tamisée à 200 mesh. Chaque échantillon de poudre est traité pendant 8 heures dans un incinérateur réalisé au laboratoire et dont la température de combustion n'excède pas 60°C. Quelques mg de poudre sont étalés en fine couche sur une plaque de verre, la pression est abaissée à 1,2 mm de mercure et un flux gazeux riche en oxygène, ionisé par un champ électro-magnétique haute fréquence, assure l'incinération. L'analyse infrarouge des échantillons est effectuée au moyen d'un spectromètre Perkin Elmer 357 en utilisant la technique des disques de bromure de potassium. On mélange intimement, à l'aide d'un « vibrating mill », $0,5 \pm 10^{-2}$ mg de tissu calcifié préalablement incinéré, avec 250 ± 1 mg de KBr puis l'ensemble est pressé à 200 kg/cm².

La détermination empirique de la valeur du pourcentage de la phase minérale cristalline par spectroscopie IR a été préconisée par TERMINE (1966). Cette méthode est basée sur l'observation du déboulement (splitting factor) de la vibration de déformation antisymétrique PO_4^{3-} , en fonction du pourcentage pondéral d'hydroxyapatite contenu dans l'échantillon osseux. L'utilisation d'une variante de cette technique, ne faisant plus intervenir des surfaces de bande mais des amplitudes (BLUMENTHAL *et al.*, 1972), a permis d'améliorer la reproductibilité des valeurs calculées. De plus, il est fabriqué 2 pastilles avec pesées indépendantes pour chaque échantillon et l'enregistrement de chacune des pastilles est répété 4 fois. L'information analogique est digitalisée et stockée sur bande papier perforée ; les données sont traitées sur ordinateur et l'emploi d'un programme de filtrage optimise au maximum la précision des résultats (± 1 p. 100 de substance minérale cristalline).

RÉSULTATS

L'analyse par diffraction des rayons X fait apparaître, quel que soit le stade de calciphylaxie, des diagrammes qui sont chacun très comparables à celui obtenu à partir d'une poudre d'os de rat témoin (fig. 1). L'enregistrement graphique de ces diagrammes à l'aide d'un microdensitomètre, permet de mesurer le diamètre des anneaux de diffraction les plus intenses [indices de Miller : (00.2) ; (21.1) (11.2)]. Les résultats révèlent la présence de phosphate de calcium cristallisé sous forme d'apatite dans les calcinoses et ce dès le stade 18 heures. Les mesures de la largeur des pics à demi-intensité (indice β) renseignent sur la taille des cristaux ; plus cet indice est grand et plus la taille des cristaux est petite. Les résultats (tabl. 1) montrent que les indices β sont grands à 24 heures puis diminuent progressivement et à partir du stade 15 jours ils sont comparables aux valeurs de l'os témoin. L'anneau (00.2) renseigne sur la longueur des cristallites et du fait du grand nombre de plans réticulaires, la raie est assez fine, d'où un indice β petit. L'anneau (21.1) (11.2) renseigne sur la largeur des cristallites ; le nombre des plans réticulaires est petit, d'où une raie diffuse avec un indice β assez grand (tabl. 1, fig. 1). Ainsi le dépôt minéral cristallin des calciphylaxies se présente d'abord sous forme de cristaux d'assez petite taille puis celle-ci augmente et devient, dès le stade 15 jours, très comparable à celle des cristaux du tissu osseux.

L'analyse par diffraction électronique à haute résolution, sur des surfaces limitées de coupes fines de plaques calciphylactiques, produit un diagramme révélant la

nature cristalline d'une partie du dépôt. La mesure des distances réticulaires donne les valeurs de d (en Å) suivantes : 3,46 ; 2,81 ; 2,00 ; 1,84 ; 1,72 ; l'anneau 2,81 est le plus intense. Ces valeurs sont comparables à celles connues pour l'hydroxyapatite.

TABLEAU I

Stade de la calciphylaxie	Indice β (a)		Pourcentage du dépôt minéral cristallin dans les calcinoses	Pourcentage du dépôt minéral cristallin dans les diaphyses fémorales (b)
	(00.2)	(21.1) (11.2)		
18 heures			32,7	
24 heures	1,7	2,6	36,2	
48 heures			37,7	58,2
4 jours	1,3	2,5	42,7	58,7
8 jours	1,2	2,5	50,6	
15 jours	1,0	2,1	56,0	58,7
16 jours	1,2	2,0	52,2	
20 jours	1,0	2,2	53,9	
30 jours	1,0	2,0	53,6	56,7
34 jours	1,1	2,3	55,8	
40 jours	1,1	2,1	53,7	58,7
65 jours	1,1	2,2	57,0 54,1	58,2
os témoin	1,0	1,9		58,4 (c)

(a) valeurs exprimées en degrés 2θ .

(b) Moyenne des valeurs obtenues pour les fémurs droit et gauche.

(c) Moyenne obtenue à partir de rats témoins d'âges comparables à ceux des animaux traités.

Mise en évidence par diffraction des rayons X et par diffraction électronique, la présence de phosphate de calcium dans les dépôts calciphylactiques est évaluée quantitativement par spectroscopie infrarouge. L'étude des spectres IR (fig. 2) permet de déterminer les proportions des phases amorphe et cristalline du dépôt minéral. Les valeurs du pourcentage de la phase minérale cristalline contenue dans la calcinose (sous forme d'apatite) à différents stades de la calciphylaxie, sont consignées dans le tableau I et permettent d'établir la figure 3. Dès le stade 18 heures, on remarque sur cette figure un pourcentage de phase cristalline de 34 p. 100, cette valeur s'accroît rapidement pour atteindre 54 p. 100 au stade 15 jours puis de 15 à 65 jours la phase minérale cristalline de la plaque calciphylactique se stabilise pour former un plateau à environ 55 p. 100. Il est à remarquer également que ce plateau se situe au-dessous

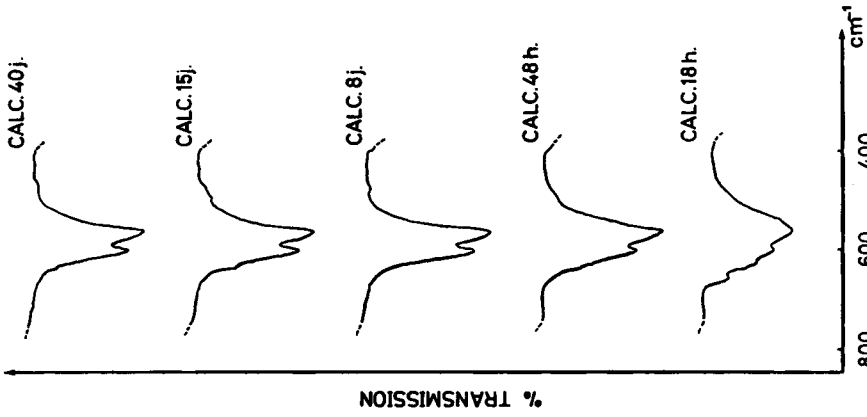


FIG. 2. — Enregistrements graphiques des spectres d'absorption infrarouge de la substance minérale des calcinose cutanées à différents stades de la calciphylaxie (calc. ; h = heures ; j = jours).

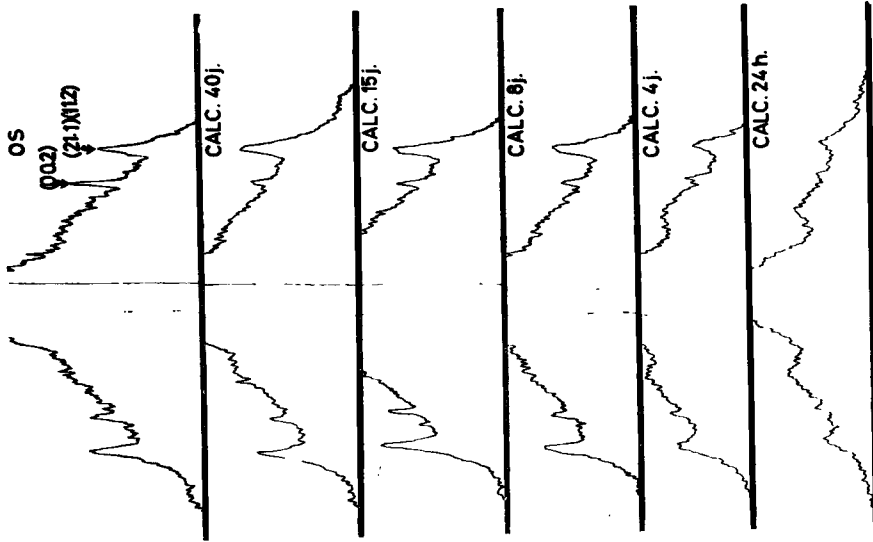


FIG. 1. — Enregistrements graphiques des diagrammes de diffraction des rayons X de la substance minérale d'os de rat témoin (os) et de celle des calcinose cutanées à différents stades de la calciphylaxie (calc. ; h = heures ; j = jours).

de la valeur moyenne des pourcentages de substance minérale cristalline enregistrés pour les fémurs des mêmes rats (tabl. 1 ; fig. 3) ; la différence entre ces deux plateaux est significative à 99 p. 100. Les pourcentages de substance minérale cristalline des

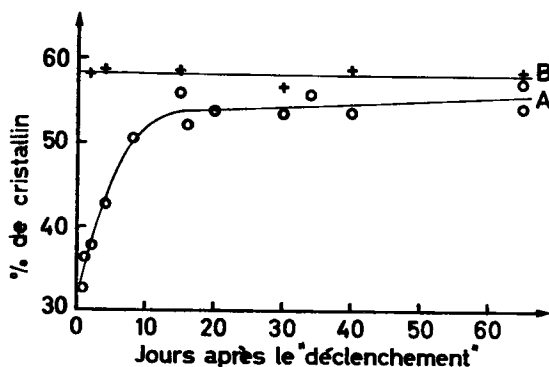


FIG. 3. — Évolution du pourcentage de la phase minérale cristalline dans les calcinose cutanées (A) et dans les diaphyses fémorales (B), en fonction du stade de la calciphylaxie.

fémurs ne présentent pas de modifications significatives en fonction du stade de la calciphylaxie et leur valeur moyenne est tout à fait comparable à celle observée pour des fémurs de rats témoins (TOCHON-DANGUY, en préparation).

DISCUSSION

L'emploi de diverses techniques biophysiques pour l'étude des calciphylaxies permet de préciser : la nature apatitique du dépôt dès le stade 18 heures ainsi que l'évolution de la taille des cristaux et de la quantité de la phase minérale cristalline au cours du développement de la calcinose.

Dans les mêmes conditions expérimentales (calcinose cutanée par calciphylaxie locale) des dépôts de nature apatitique sont observés par diffraction des rayons X à des stades égaux ou supérieurs à 4 jours (MOSS et URIST, 1964 ; BAUD et DUPONT, 1966 ; SCHIBLER et FLEISCH, 1966 ; GABBIANI *et al.*, 1969 ; PEARCE *et al.*, 1972) et par diffraction électronique dès le stade 48 heures (GABBIANI *et al.*, 1969 ; BAUD et BADONNEL, 1970). Notons que MOSS et URIST (1964) puis PEARCE *et al.* (1972) ne remarquent pas la présence d'un dépôt minéral cristallin avant les stades 4 et 6 jours respectivement. Cette différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par des variations : dans les traitements « déclenchants » (mécanique pour eux ; chimique pour nous), dans la nature des tissus qui se minéralisent (épidermique ou dermique), dans les modes de préparation, ou encore dans les techniques de détection ; ces variations provoqueraient un décalage dans l'évaluation de la chronologie de la réaction. La substance minérale cristalline trouvée dans les dépôts calciphylactiques est de même nature que celle de certaines calcifications expérimentales ou pathologiques (voir dans BAUD et BADONNEL, 1970 puis GABBIANI *et al.*, 1970 ; BONUCCI et SADUN, 1973 ; GABBIANI *et al.*, 1973 ; KIM et TRUMP, 1975), du cartilage en voie

de minéralisation (BONUCCI, 1967 ; ANDERSON, 1969 ; HJERPE *et al.*, 1973) et du tissu osseux normal.

Sur des calciphylaxies cutanées, GABBIANI *et al.* (1969) puis BAUD et BADONNEL (1970) révèlent la présence, dans le dépôt minéral, d'un matériel peu ou pas cristallisé en plus de la partie apatitique. Ces observations sont confirmées par nos résultats de spectroscopie infrarouge qui montrent l'existence dans le dépôt minéral calciphylactique, de deux phases (amorphe et cristalline) de phosphate de calcium. Ces derniers résultats sont à mettre en parallèle avec notre description ultrastructurale (BORVIN, 1975) de deux types de dépôts dans la calciphylaxie : des chaînes de petits grains (amorphe) et des aiguilles homogènes (cristallin). Par ailleurs, des études par microscopie électronique ont permis à KIM et TRUMP (1975) dans des calcifications de valves aortiques humaines et à MILLER et SCHRAER (1975) dans le tissu osseux médullaire des oiseaux, de décrire respectivement 3 et 2 types morphologiques de particules qui seraient les précurseurs amorphes d'une phase cristalline d'hydroxyapatite. L'absence de travaux sur l'évolution chronologique des phases minérales (amorphe ou cristalline) au cours de calcifications expérimentales ou pathologiques, ne permet pas de situer nos résultats. Cependant l'examen par diffraction des rayons X, d'échantillons de paraostéarthropathies (POA), a permis à BAUD *et al.* (1972) de relater une augmentation de la phase cristalline durant le développement de la POA.

La détermination quantitative par spectroscopie infrarouge de la phase cristalline des tissus calcifiés, nécessite le contrôle de certains facteurs caractéristiques de chaque substance étudiée.

1° La variation du poids de phosphate de calcium contenu dans le disque de bromure de potassium analysé par spectroscopie infrarouge, modifie l'amplitude des spectres obtenus et perturbe la détermination du pourcentage de la phase minérale cristalline (TERMINE, 1966). Nous avons montré que les variations enregistrées pour des échantillons osseux semblables, prélevés sur des sujets de même espèce et d'âge comparable, n'engendrent sur la valeur du pourcentage de la phase minérale cristalline calculé, qu'une erreur inférieure à la précision de la technique (TOCHONDANGUY, 1974). Cependant, les premiers stades de la calciphylaxie (18 et 24 heures) présentent un dépôt minéral nettement moins abondant que les stades ultérieurs. Pour étudier ce matériel dans des conditions comparables, tous nos échantillons ont préalablement été incinérés à basse température pendant 8 heures. De ce fait, la valeur du pourcentage du dépôt minéral cristallin, déterminée à partir de substance minérale incinérée, doit être interpolée à l'aide d'une courbe standard correspondant à un matériel non protéiné. Cette technique d'incinération, déjà utilisée (GLEIT et HOLLAND, 1962 ; GLEIT, 1963 ; DUPRÉ LA TOUR et BOUDJICANIAN, 1970 ; HISASHI, 1971 ; KATO et OGURA, 1975 ; MILLER et SCHRAER, 1975), ne semble pas modifier la composition chimique de la substance minérale. De même, de récents travaux effectués au laboratoire ne montrent pas de transformation significative des phases amorphe ou cristalline du phosphate de calcium après 8 heures de traitement par un flux gazeux, riche en oxygène, ionisé. Il est à noter cependant que 0,5 mg de tissu calcifié incinéré ainsi obtenu, présente sur le spectre infrarouge une absorption δ PO_4^- plus intense pour la calcinose cutanée que pour le fémur du même rat.

2° La taille des cristaux est un autre caractère pouvant affecter la détermination du « splitting factor » (TERMINE, 1966) et, de ce fait, elle pourrait être responsable de la différence du pourcentage de substance minérale cristalline observée

entre les plateaux des figures 3 A et 3 B. Or les indices β mesurés pour l'os témoin et pour les calciphylaxies comprises entre 15 et 65 jours (tabl. 1) sont identiques.

La différence observée, entre le pourcentage du dépôt minéral cristallin des calciphylaxies supérieures à 15 jours et celui du tissu osseux, n'est donc liée ni à la différence du degré de minéralisation, ni à la taille des cristaux. Par ailleurs, pour les premiers stades étudiés, l'influence du taux de minéralisation peut être écartée (poids de substance minérale équivalent dans chaque échantillon analysé). Ainsi la forte augmentation du pourcentage de la phase minérale cristalline pendant les stades initiaux ainsi que la croissance simultanée de la taille des cristaux, rendent compte de l'évolution propre des phases minérales de la calcinose.

De nombreuses substances, telles que le magnésium, les carbonates, les pyrophosphates et les nucléotides en quantités suffisantes, préviendraient *in vitro* la transformation du phosphate de calcium synthétique amorphe, en hydroxyapatite (BACHRA, 1963; FLEISCH, 1964; BACHRA *et al.*, 1965; HEUGHEBAERT et BARATALI, 1974; TERMINE et CONN, 1975). Pour tenter d'expliquer le pourcentage du dépôt minéral cristallin moins élevé dans la calcinose que dans le tissu osseux du rat, il sera intéressant de déterminer et de comparer, pour chacun de ces tissus, les concentrations de ces substances inhibitrices de la cristallisation. GABBIANI *et al.* (1970) ont montré que la formation *in vitro* d'apatite était favorisée par le fer. Cet élément, introduit lors du traitement « déclenchant », pourrait agir sur la transformation de phases du phosphate de calcium. Aussi nous nous proposons d'étudier l'influence du fer sur la valeur du pourcentage de la phase minérale cristalline des calciphylaxies.

Il est toutefois important de mentionner ici que HEUGHEBAERT et MONTEL (1975) ont montré *in vitro* qu'au cours du séchage du phosphate de calcium, sa structure apatitique apparaît de plus en plus nettement à la faveur de l'accroissement de sa teneur en ions OH^- et HPO_4^{2-} . La présence de ces ions, liée à une hydrolyse interne, pourrait intervenir dans l'évolution des phases du dépôt minéral osseux ou calciphylactique au cours de la préparation des échantillons (broyage et séchage des poudres).

Dans un travail précédent (BOIVIN, 1974), nous avons montré qu'au stade 8 jours les fémurs de rats calciphylactiques présentaient des zones de résorption sans qu'il y ait de modifications du taux de minéralisation de l'os restant. Nos présents résultats sur l'évolution du pourcentage de la phase minérale cristalline du fémur en fonction du développement de la calciphylaxie, ne révèlent pas de variation significative de ce pourcentage entre les stades 18 heures et 65 jours en général et entre les stades 18 heures et 8 jours en particulier. Ainsi la résorption osseuse due à la calciphylaxie ne se fait pas au détriment d'une des phases minérales. Ceci rejoint l'idée de BAUD et POUZAT (1975) qui pensent que la perte osseuse, relative à des conditions expérimentales de résorption massive et rapide, est non sélective vis-à-vis des 2 phases minérales (amorphe et cristalline).

Par une analyse infrarouge, chaque tissu calcifié (dentine, émail, tissus osseux normaux ou pathologiques, calcifications expérimentales) montre un pourcentage du dépôt minéral cristallin particulier à ce tissu. Ceci nous apparaît très important et met l'accent sur le rôle du « milieu » au sein duquel se réalise la minéralisation. Ainsi il est probable que dans notre cas de calciphylaxie locale, nous obtenons un pourcentage de cristallin en rapport avec la nature et la composition du tissu conjonctif sous-cutané.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué avec l'aide du Fond National Suisse de la Recherche Scientifique. Les auteurs expriment leur respectueuse gratitude à M. le Professeur C. A. BAUD (Directeur de l'Institut de Morphologie) pour ses précieux conseils tout au long de ce travail. Ils remercient M^{me} M. ROSNOBLET et M. J.-P. GERBER pour leur aimable contribution à la présentation du manuscrit et de l'illustration photographique.

SUMMARY

CUTANEOUS CALCINOSIS INDUCED BY CALCIPHYLAXIS IN THE RAT.

II. — BIOPHYSICAL ASPECTS OF THE MINERAL SUBSTANCE

The mineral substance of cutaneous calcinosis induced by topical calciphylaxis in the rat (stages 18 hours to 65 days) is analyzed by electron diffraction, X-ray diffraction and infrared spectroscopy.

The results obtained : 1) show two calcium phosphate phases (amorphous and crystalline) in the mineral substance of the calcinosis ; 2) define the apatite nature of the crystalline phase and show that the crystal size of the calciphylactic mineral deposit increases to a value similar to that of bone mineral crystals ; 3) reveal a high increase (from stages 18 hours to 15 days) followed by stabilization (stages 15 to 65 days) of the percent of crystalline mineral during development of calcinosis ; 4) permit comparison with the mineral bone substance of treated rats. The significant difference between the mean values of the percent of calcinosis crystalline mineral and those of bone tissue at stages 15 to 65 days is discussed.

Our results are compared to some biophysical data obtained during the study of experimental or pathologic calcification and normal bone tissue.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDERSON H. C., 1969. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.*, **41**, 59-72.
- BACHRA B. N., 1963. Precipitation of calcium carbonates and phosphates from metastable solutions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **109**, 251-255.
- BACHRA B. N., TRAUTZ O. R., SIMON S. L., 1965. Precipitation of calcium carbonates and phosphates. III. The effect of magnesium and fluoride ions on the spontaneous precipitation of calcium carbonates and phosphates. *Arch. oral Biol.*, **10**, 731-738.
- BAUD C. A., BADONNEL M. C., 1970. Electron-microscope and electron-diffraction study of experimental cutaneous calcinosis. *Clin. Orthop.*, **69**, 55-65.
- BAUD C. A., DUPONT D. H., 1966. La structure submicroscopique des dépôts de substance minérale dans la calcinose cutanée expérimentale (calciphylaxie). *Experientia*, **22**, 18.
- BAUD C. A., POUÉZAT J. A., 1975. Morphological and crystallographic analysis of bone mineral. In : « Calcium metabolism, bone and metabolic bone diseases ». Ed. by KUHLENCORDT F., KRUSE H. P., Springer-Verlag Berlin. 3-13.
- BAUD C. A., POUÉZAT J. A., VERY J. M., 1972. Étude biophysique de la substance minérale. In : « Symposium sur les paraostéarthropathies (POA) ». Commission des Communautés Européennes (CECA). *Coll. « Traumatologie et Réadaptation »*, n° 3, Luxembourg. 271-275.
- BLUMENTHAL N. C., POSNER A. S., HOLMES J. M., 1972. Effect of preparation conditions on the properties and transformation of amorphous calcium phosphate. *Mat. Res. Bull.*, **7**, 1181-1190.
- BOIVIN G., 1974. Étude chez le rat d'une calcinose cutanée induite par calciphylaxie locale. *Aspects ultrastructuraux et biophysiques des phases initiales et d'accroissement de la calcification. Répercussions sur le tissu osseux*. Thèse de 3^e cycle biologie animale, Université de Paris VII.
- BOIVIN G., 1975. Étude chez le Rat d'une calcinose cutanée induite par calciphylaxie locale. I. Aspects ultrastructuraux. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, **64**, 183-205.

- BONUCCI E., 1967. Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.*, **20**, 33-50.
- BONUCCI E., SADUN R., 1973. Experimental calcification of the myocardium. Ultrastructural and histochemical investigations. *Am. J. Pathol.*, **71**, 167-192.
- COUSINS F. B., SMILLIE A. C., 1965. Studies on a skin calcifying system. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, **43**, 785-802.
- DUPRÉ LA TOUR F., BOUDJICANIAN K., 1970. Procédé simplifié de minéralisation des tissus à basse température. Application à l'étude des néphrocalcinoses. *Ann. Biol. clin.*, **28**, 303-307.
- FLEISCH H., 1964. Role of nucleation and inhibition in calcification. *Clin. Orthop.*, **32**, 170-180.
- GABBIANI G., BADONNEL M. C., BAUD C. A., 1969. Relationship between iron, calcium and phosphate during experimental cutaneous calcinosis. *Calcif. Tiss. Res.*, **4**, 224-230.
- GABBIANI G., TUCHWEBER B., PERRAULT G., 1970. Studies in the mechanism of metal-induced soft tissue calcification. *Calcif. Tiss. Res.*, **6**, 20-31.
- GABBIANI G., TUCHWEBER B., SELYE H., 1973. Experimental ectopic calcification (calciophylaxis and calcergy). In : « *Biological mineralization* ». Ed. by ZIPKIN I., Wiley, New York., 547-586.
- GLEIT C. E., 1963. Electronic apparatus for ashing biologic specimens. *Am. J. Med. Electron.*, **2**, 112-118.
- GLEIT C. E., HOLLAND W. D., 1962. Use of electrically excited oxygen for the low temperature decomposition of organic substances. *Anal. Chem.*, **34**, 1454-1457.
- HEUGHEBAERT J. C., BARATALI T., 1974. Influence des ions magnésium et manganèse (II) sur la constitution et les propriétés du phosphate tricalcique précipité. *C. R. Acad. Sc. Paris, série C*, **278**, 247-250.
- HEUGHEBAERT J. C., MONTEL G., 1975. Sur la transformation des phosphates amorphes en phosphates apatitiques par réaction intracristalline. In : « *Physico-Chimie et Cristallographie des Apatites d'Intérêt Biologique* ». Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique, n° 230. Éditions du C.N.R.S., Paris, 283-293.
- HISASHI S., 1971. Activated oxygen ashing of biological specimens for the microdetermination of Na, K, Mg and Ca by atomic absorption spectrophotometry. *Anal. Biochem.*, **42**, 21-28.
- HJERPE A., ENGFELDT B., GLAS J. E., 1973. The nature of mineral deposit in rat costal cartilage. *Acta path. microbiol. scand. A*, **81**, 862-865.
- KATO Y., OGURA H., 1975. Low-temperature ashing of bovine dentine. *Calcif. Tiss. Res.*, **18**, 141-148.
- KIM K. M., TRUMP B. F., 1975. Amorphous calcium precipitations in human aortic valve. *Calcif. Tiss. Res.*, **18**, 155-160.
- MILLER A. L., SCHRAER H., 1975. Ultrastructural observations of amorphous bone mineral in avian bone. *Calcif. Tiss. Res.*, **18**, 311-324.
- MOSS M. J., URIST M. R., 1964. Experimental cutaneous calcinosis. *Arch. Path.*, **78**, 127-133.
- PEARCE E. I. F., COUSINS F. B., SMILLIE A. C., 1972. The mineralization of hair follicle tissue. I. An *in vivo* study. *Calcif. Tiss. Res.*, **8**, 228-236.
- SCHIBLER D., FLEISCH H., 1966. Inhibition of skin calcification (calciophylaxis) by polyphosphates. *Experientia*, **22**, 367-369.
- SELYE H., 1962. *Calciophylaxis*. The University of Chicago Press, Chicago.
- TERMINE J. D., 1966. *Amorphous calcium phosphate : the second mineral of bone*. Ph. D. Thesis. Cornell University, New-York.
- TERMINE J. D., CONN K. M., 1975. Metabolic phosphate ester and phosphoprotein inhibition of apatite formation in synthetic lymph media. *J. Dent. Res.*, **54A**, L103 (Abstract).
- TOCHON-DANGUY H. J., 1974. Diagnostic des ostéoporoses : minéral amorphe et minéral cristallin. (Communication personnelle.)