Pathological calcifications: a medical diagnosis based on their physicochemical properties

Dominique Bazin, Jean-Philippe Haymann, Letavernier Emmanuel, Julie Rode, Michel Daudon

▶ **To cite this version:**

Dominique Bazin, Jean-Philippe Haymann, Letavernier Emmanuel, Julie Rode, Michel Daudon. Pathological calcifications: a medical diagnosis based on their physicochemical properties. La Presse medicale, 2014, 43 (2), pp.135-48. 10.1016/j.lpm.2013.02.333 . hal-00996294

HAL Id: hal-00996294

https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-00996294

Submitted on 26 May 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Calcifications pathologiques : un diagnostic médical basé sur leurs paramètres physicochimiques

Dominique Bazin[1,2], Jean-Philippe Haymann[3], Emmanuel Letavernier[3], Julie Rode[3], Michel Daudon[3]

1. CNRS, laboratoire de chimie de la matière condensée de Paris, UPMC, collège de France, 75231 Paris cedex 05, France
2. Université Paris-XI, laboratoire de physique des solides, 91405 Orsay cedex, France 3. AP–HP, hôpital Tenon, service d'explorations fonctionnelles, 75970 Paris cedex 20, France

Correspondance : Michel Daudon, AP–HP, hôpital Tenon, service d'explorations fonctionnelles, 4, rue de la Chine, 75970 Paris cedex 20, France. michel.daudon@tnn.aphp.fr

Key points. Pathological calcifications: A medical diagnosis based on their physicochemical properties This paper gathers different investigations dedicated to pathological calcifications made of apatite in order to define the structural characteristics, which display a clinical significance. Such approach helps the clinician to define the cha-racterisation tools, which have to be combined to obtain such structural characteristics in order to establish a possible relationship between the structural characteristics of the patholo-gical calcifications and the disease. The fact that it is now possible to perform such experiments at the subcellular scale gives new opportunities for a large number of diseases associated to pathological calcification. Moreover, new diagnostic tools based on these characteri-sation techniques, quite sensitive to analyze microcrystals, can be defined.

Points essentiels. Une analyse de la littérature dédiée aux calcifications pathologiques composées d'apatites a été effectuée pour en dégager les paramètres physicochimiques possédant une signification clinique. Ces paramètres en retour définissent les techniques de caractérisation qu'il convient de mettre en œuvre pour établir éventuellement un lien entre la pathologie et les paramètres physicochimiques qui pilotent la pathogenèse de ces calcifications. Cette démarche permet aussi de proposer ces techniques de caractérisation comme des outils de diagnostic d'autant plus précoce qu'elles sont capables de décrire la physicochimie de microcristaux. La définition d'une telle approche est d'autant plus nécessaire que l'avènement de techniques de caractérisation capables de réaliser ces observations à l'échelle subcellulaire catalyse une nouvelle recherche, notamment dans les centres de rayonnement synchrotron où la taille de la sonde avoisine désormais la dizaine de nanomètres.

Sur le plan médical, les calcifications pathologiques sont définies comme des dépôts minéraux anormaux, calciques ou non, dans un tissu ou un organe. Une classification usuelle simplifiée en distingue trois familles. La première correspond aux concrétions solides observées dans une cavité ou un canal excréteur (calculs rénaux [1–4], pancréatiques [5], biliaires [6], salivaires [7]). La deuxième se réfère aux calcifications ectopiques, c'est-à-dire localisées dans le tissu [8]. Elles peuvent s'observer dans des pathologies sévères comme les cancers du sein, de la thyroïde, des testicules ou encore de la prostate. Enfin, des calcifications physiologiques sont susceptibles d'évoluer vers des formes pathologiques après une maladie ou une altération des systèmes physiologiques (tissu osseux et ostéoporose).

Un vaste ensemble d'affections s'accompagne donc de calcifications pathologiques puisque ces dernières sont observables en cas de cancers [9–11], d'infections [12,13], de maladies génétiques [14–16] ou environnementales [17,18]. Il convient aussi de souligner la séquence chronologique qui existe entre l'augmentation du poids corporel, le développement d'un syndrome métabolique et l'accroissement du risque de lithiase avec une évolution potentielle vers un diabète de type II [19,20]. Enfin, les calcifications pathologiques sont aussi associées au processus de vieillissement [21].

Dans cet article, nous nous focaliserons sur le lien de cause à effet qui existe pour la lithiase [22–24], et qui s'esquisse pour d'autres organes comme la prostate [25], entre la pathologie et certaines caractéristiques physicochimiques de la calcification qui l'accompagne [26,27]. Les résultats récents que nous avons obtenus concernant les calcifications présentes au niveau du rein [28], de la prostate [29], de la thyroïde, de valves aortiques [30] et du cartilage [31] sont mis en perspective avec d'autres travaux comme ceux inhérents notamment aux cancers du sein [9,10] afin d'en apprécier les similitudes et les différences. Cette approche comparative tente ainsi de définir une démarche expérimentale plus générale basée sur des techniques de caractérisation de laboratoire ou spécifiques aux grands instruments [32], afin d'établir un lien entre calcifications non désirées et pathologie. Pour le clinicien, s'ouvrent des opportunités sur la possibilité de poser un diagnostic médical précoce. Les derniers développements technologiques autorisent en effet la caractérisation de calcifications de dimension submicrométrique.

Liens entre calcifications et pathologies.

Dans les reins et probablement dans beaucoup d'autres organes, la nature et les caractéristiques physicochimiques des calcifications apportent des informations essentielles sur la pathologie ou les anomalies biochimiques qui en sont responsables. Ainsi, au niveau rénal, la struvite est un marqueur spécifique des infections de l'appareil urinaire par des microorganismes uréolytiques [33,34]. La cystine témoigne d'une tubulopathie génétique (cystinurie) [35,36] ou d'un déficit de synthèse de la cystinosine conduisant à une accumulation intralysosomale de cystine (cystinose) [37,38]. Dans certains cas, il existe une relation univoque entre la nature chimique de la calcification et la pathologie. Il en est ainsi au niveau rénal pour la dihydroxyadénine qui révèle un déficit génétique en adénine phosphoribosyltransférase [39–42]. D'autres phases insolubles observées dans le rein orientent vers des contextes pathologiques particuliers où des facteurs extérieurs très

spécifiques sont impliqués comme la silice opaline qui suppose une charge en dérivés minéraux du silicium [43,44], l'acide méthyl-1-urique qui est toujours associé simultanément à la consommation de caféine et à une imprégnation aluminique, ou encore certains métabolites médicamenteux qui supposent un traitement aigu ou chronique par des doses élevées de médicaments dont le principe actif ou les métabolites sont peu solubles [45–47]. Dans le cas des calcifications mammaires, la présence de phosphate de calcium carbonaté apatitique à faible teneur en carbonate a été décrite comme un marqueur de malignité en raison de son association à des tumeurs cancéreuses [48].

TABLEAU I
Principales phases chimiques et localisation

Phase chimique identifiée	Localisation
Sels calciques	
Apatite de calcium carbonatée (CA) $Ca_{10-x+u}M_{x-u}(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x(OH)_{2-x+2u}$ avec M lacunes, $x \leq 2$ et $u \leq x/2$	Rein, sein, thyroïde, cartilage, vessie, prostate, glandes salivaires, appareil circulatoire (veines, artères, cœur), peau, muscle, placenta
Whitlockite ($Ca_3MgH(PO_4)_7$)	Rein, cartilage, poumons, système cardiovasculaire, prostate, disques intervertébraux, glandes salivaires, intestin
Oxalate de calcium monohydraté (COM) $CaC_2O_4 \cdot H_2O$	Rein, prostate, rétine, os, vaisseaux
Oxalate de calcium dihydraté (COD) $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$	Rein, sein, thyroïde, prostate
Oxalate de calcium trihydraté (COT) $CaC_2O_4 \cdot 3H_2O$	Rein
Polymorphes du carbonate de calcium (calcite, aragonite, vatérite) $CaCO_3$	Pancréas, foie, vésicule et voies biliaires, rein (calcite)
Pyrophosphate de Ca	Cartilage, ménisque, liquide synovial
Palmitate de calcium, stéarate de calcium	Vésicule biliaire, intestin
Autres composés	
Cholestérol	Vésicule et voies biliaires, rein, liquide synovial, kystes de localisations variées
Cystine	Rein, cornée
Dihydroxy-2,8-adénine	Rein
Acides uriques	Rein, kystes rénaux
Urate acide de sodium monohydraté	Rein, liquide synovial, tophi
Urate acide d'ammonium anhydre	Rein
Xanthine	Rein, articulations

Caractère ubiquitaire des calcifications

Des calcifications ont été décrites dans de nombreux organes : les reins [49,50], le pancréas [51], le cerveau [52], les glandes mammaires [53–55], les glandes salivaires [56], le système cardiovasculaire [57,58], l'épiderme [59], le foie, la vésicule et les voies biliaires [6,60], la prostate [61], les poumons [62], le placenta [63], le diaphragme [64,65], les cartilages [66], les disques intervertébraux [67], les ménisques [68], les ligaments [69], sans oublier la plaque dentaire [70,71]. L'utilisation du terme générique « calcification » est théoriquement impropre car tous les dépôts cristallins intratissulaires ne contiennent pas du calcium. Rappelons que les tophi goutteux associés à l'hyperuricémie sont faits d'urate acide de sodium monohydraté. Les dépôts épithéliaux des pyélites incrustantes sont faits de struvite et différentes images de néphrocalcinose sont en fait le résultat d'une accumulation dans le tissu rénal de cristaux de

nature diverse, mais parfois non calciques comme la dihydroxyadénine. De plus, parmi les sels calciques, il existe différentes formes cristallines conduisant à des pathologies parfois très différentes. Il est donc souvent intéressant, et même essentiel dans certains cas, d'utiliser les caractéristiques physicochimiques des calcifications comme outil diagnostique et de rechercher plus précisément le lien existant entre les calcifications observées et un contexte pathologique donné pour les différents organes où elles peuvent être caractérisées [2,4,72,73].

Différents types de calcifications et physicochimie associée

Sur le plan physicochimique, les calcifications pathologiques sont des biomatériaux complexes associant bien souvent une partie minérale et une partie organique ainsi que des éléments traces. Ces matériaux biologiques hybrides exhibent une structure hiérarchique, tout au moins pour la partie minérale dans laquelle des nanocristaux s'assemblent pour former des microcristallites, l'agglomération de ces derniers formant la calcification [74]. Les calcifications pathologiques (mais aussi physiologiques) sont issues d'une chimie douce [75], c'est-à-dire que leur synthèse s'effectue à température et pression ambiantes pour des valeurs de pH limitées par la biochimie et qui s'inscrivent entre 5 et 8. Projeter les concepts de la chimie douce dans cette problématique médicale constitue donc une opportunité sans équivalence pour en décrire les mécanismes biochimiques associés. Dans cette démarche, nous pouvons d'ores et déjà prendre en compte la cinétique et la thermodynamique dans la compréhension des processus de biochimie qui conditionnent la pathogenèse de ces calcifications.

Ainsi, dans le cas des calculs rénaux d'oxalate de calcium, la thermodynamique est prédominante lorsque l'on s'intéresse aux hyperoxaluries avec comme phase chimique générée la whewellite ($CaC_2O_4.H_2O$). Au contraire, la thermodynamique s'efface au profit de la cinétique de la réaction dans le cas des hyper-calciuries avec cette fois la weddellite ($CaC_2O_4.2H_2O$) comme phase chimique présente dans les calculs. Pour ce qui touche aux processus de germination-croissance, deux types de processus de nucléation primaire existent dans une urine sursaturée. Si une proportion limitée de calculs se forme suivant un processus de nucléation homogène (i.e. une simple précipitation engendrée par une sursaturation), on observe de plus en plus leur formation dans le cadre d'un processus de nucléation hétérogène liée notamment à la présence à la surface de l'épithélium papillaire d'une calcification développée initialement dans l'interstitium et appelée plaque de Randall qui joue le rôle de centre nucléateur [76,77]. Cet ensemble complexe de notions médicales et physicochimiques nous conduit, afin d'établir un lien entre pathologie et caractéristiques physicochimiques de la calcification, à considérer les différents éléments suivants : les formes amorphes ou cristallines, la teneur en carbonate, la teneur en éléments traces, la morphologie des cristallites.

Nous nous limiterons toutefois, pour des raisons de clarté, aux calcifications dont l'apatite est la principale composante [78–80] et tenterons de répondre à la question suivante : les calcifications non désirées ont-elles toujours un caractère pathologique, c'est-à-dire la capacité d'altérer le fonctionnement de l'organe ou du tissu où elles se forment ? Calcification bénigne ou pathologique ?

Le caractère pathologique des calcifications n'est pas toujours reconnu. Alors qu'une concrétion au niveau du rein est souvent, mais pas toujours, considérée comme pathologique, certaines calcifications présentes dans les poumons [81] ou les glandes mammaires [82] peuvent être considérées comme bénignes, c'est-à-dire sans retentissement fonctionnel sur l'organe où elles sont observées. De même, dans le cartilage de l'articulation du genou, des calcifications sont observées chez de très jeunes patients [83] mais, à ce jour, elles ne constituent pas un risque ultérieur de détérioration du cartilage. Néanmoins, il convient de souligner que l'interaction entre les calcifications et le tissu a fait l'objet de nombreuses études in vivo. Ainsi, dans le cas de la whitlockite, Klein et al. [84] ont évoqué un processus d'inflammation impliquant certaines cellules du tissu osseux. Une étude similaire publiée par Semmelin et al. [85] suggère de plus une réponse immunitaire en regard des processus de cristallisation. Plus récemment, différents travaux ont montré que la présence de cristaux peut induire une modification du fonctionnement cellulaire [86,87], une inflammation [88,89] ou encore une modification du phénotype de la cellule [90]. De ce fait, le caractère pathologique d'une calcification se doit d'être considéré dans la plupart des cas.

Composition chimique

Nous avons déjà souligné la grande diversité des phases chimiques identifiées dans les calcifications pathologiques [28,29]. Dans le cas du rein, une centaine a été rapportée dans les calculs rénaux. Une compilation non exhaustive de la littérature est présentée dans le tableau I qui précise la localisation des calcifications pour chacune des phases chimiques.

Principales techniques physiques d'investigation

Au cours des dernières décennies, l'émergence de nouveaux concepts en physique [91–93] a suscité le développement de dispositifs expérimentaux originaux liés ou non aux grands instruments i.e. aux centres de rayonnement synchrotron ou aux réacteurs nucléaires de recherche [94–99]. Les derniers développements technologiques inhérents aussi bien à l'optique qu'aux systèmes de détection ont parfait le protocole de mesure en offrant la possibilité d'une caractérisation en temps réel et à l'échelle subcellulaire [100–105].

Sur le plan médical, ces nouvelles opportunités ont permis toute une série d'avancées significatives [106–109]. Plus précisément, lorsque l'on se focalise sur les calcifications pathologiques, au moins deux types sont en cours de réalisation. Le premier porte sur la compréhension des processus biochimiques qui pilotent la pathogenèse de ces calcifications, le second sur la précocité du diagnostic médical [110]. Rappelons ici que la première expérience réalisée sur le nouveau centre de rayonnement synchrotron français, SOLEIL (Source optimisée de lumière d'énergie intermédiaire du LURE) a été effectuée sur un calcul rénal [111]. Les nouveaux développements technologiques ont considérablement amélioré la sensibilité des techniques physiques de caractérisation, qu'il s'agisse des techniques conventionnelles comme la spectroscopie infrarouge, la diffraction des rayons X ou la microscopie électronique à balayage. De plus, la dimension des échantillons analysables a été considérablement réduite, permettant l'étude de prélèvements biologiques à l'échelle micrométrique et même subcellulaire, voire encore inférieure pour certaines techniques. Dans le cas d'une calcification pathologique, les techniques utilisables doivent permettre de

répondre à plusieurs questions : quelle est sa nature chimique ? Quelle est sa forme cristalline ? Quelles sont ses caractéristiques morphologiques ou structurales et quelle est leur signification biochimique et/ou pathologique ? Compte tenu des informations à collecter, nous avons eu recours à plusieurs techniques complémentaires dont les apports respectifs sont brièvement décrits ci-dessous.

Ces dispositifs expérimentaux sont basés pour la plupart sur les interactions électrons-matière ou neutrons-matière. Ils permettent au sein des calcifications :

- d'identifier les différents éléments par fluorescence X. Ainsi, le clinicien est à même de mettre en évidence dans une biopsie la présence de néphrotoxiques comme le mercure, le plomb ou le cadmium ;

- de préciser pour chaque élément son état d'oxydation par spectroscopie d'absorption X. Par exemple, différencier le chrome VI du chrome IV constitue une information cruciale pour le clinicien ;

- de déterminer la nature des liaisons chimiques entre ces éléments par spectroscopie infrarouge. En précisant la composition chimique de la calcification i.e. en mettant en évidence la présence de struvite dans un calcul rénal, le clinicien en perçoit la nature infectieuse ;

- d'évaluer les désordres tissulaires par spectroscopie UV visible puisque cet outil est apte à décrire l'accumulation pathologique de certaines protéines, cette agglomération pouvant être reliée à des pathologies comme les myélomes.

Sans entrer dans le détail des formalismes théoriques sousjacents et sans être exhaustif, nous allons présenter différentes techniques jouant un rôle clé à l'interface physique–chimie–médecine en commençant par une description sommaire d'un grand instrument, le synchrotron.

Rayonnement synchrotron

C'est un rayonnement électromagnétique émis par un faisceau d'électrons dont la vitesse approche celle de la lumière, maintenu à l'aide d'aimants supraconducteurs pour certains sur une trajectoire fermée. Inauguré fin 2006, le centre national de rayonnement synchrotron, le synchrotron SOLEIL, ne se limite pas à une source de rayonnement électromagnétique aux propriétés exceptionnelles en termes de brillance, grandeur physique reliée au nombre de photons émis et ce sur une large gamme spectrale s'étendant des rayons X durs au térahertz. Ce laboratoire de recherche à part entière constitue également un carrefour sans équivalence où différentes thématiques liées à la physique, la chimie, la biologie et la médecine s'interpénètrent.

Effectuer des expériences implantées sur ces bâtis expérimentaux, aussi dénommés lignes de lumière, ne se restreint donc pas à l'acquisition de données dont la qualité en termes de rapport signal sur bruit est sans équivalence. Il s'agit aussi d'une opportunité de bénéficier,

par des échanges avec les responsables scientifiques, des nouveaux concepts ou encore des nouveaux développements technologiques en cours.

Spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier

Elle consiste à exposer l'échantillon à un faisceau infrarouge polychromatique et à enregistrer son spectre d'absorption moléculaire. L'intérêt de cette technique est de permettre de caractériser aussi bien des composés minéraux qu'organiques, cristallisés ou amorphes, purs ou mélangés. Elle est donc particulièrement intéressante pour identifier les espèces cristallines et détecter la matrice organique qui les accompagne.

Lorsque les cristaux sont observés au sein de coupes tissulaires, on peut les identifier par microscopie infrarouge. Pour ce faire, les biopsies sont déposées non pas sur une lame de verre classique mais sur une lame de verre métallisée compatible avec l'acquisition de spectres d'absorption infrarouge mais aussi avec les techniques de coloration liée à l'histochimie.

En raison de la taille micrométrique du faisceau (de 30 mm pour un imageur infrarouge de laboratoire à 6 mm pour un dispositif implanté sur une source de rayonnement synchrotron), il est possible de connaître précisément la composition chimique de calcifications ectopiques de dimension micrométrique et de les localiser au sein des différentes parties du tissu.

Fluorescence X

Lorsque l'on bombarde de la matière avec des photons d'énergie suffisante, les photons incidents éjectent un électron de coeur du cortège électronique de l'atome. Le retour à l'état fondamental de l'atome ainsi placé dans un état excité s'accompagne d'une émission de photons dénommés photons de fluorescence. La fluorescence X est un processus radiatif lié au réarrangement du cortège électronique. L'énergie des photons de fluorescence permet d'établir la liste des divers éléments présents. Ainsi, lorsque le clinicien recherche des éléments toxiques comme le plomb ou d'autres éléments lourds, la réponse peut provenir d'expériences de fluorescence X.

Spectroscopie d'absorption X

Mettre en évidence des éléments lourds n'est pas toujours suffisant. Le clinicien peut aussi vouloir connaître leur état d'oxydation. C'est le cas du chrome, élément pour lequel il convient de distinguer le CrVI du CrIV. La spectroscopie d'absorption différencie ces deux états. Cette technique permet aussi de décrire précisément la première sphère de coordination, c'est à dire de définir la nature et le nombre des atomes voisins de chacun des éléments présents au sein du matériau [112].

Microscopie électronique à balayage

Imager les calcifications pathologiques, se présentant sous la forme de concrétions ou bien encore insérées dans un tissu à l'échelle mésoscopique (c'est-à-dire micrométrique), se révèle essentiel. La microscopie électronique à balayage permet non seulement une connaissance

concise de la topologie de la calcification à une échelle submicronique mais aussi sa cartographie chimique en précisant la distribution spatiale des différents éléments à l'exception toutefois des éléments traces.

Notons que les microscopes électroniques à balayage de dernière génération que nous avons mis en oeuvre permettent de s'affranchir du dépôt de graphite utilisé antérieurement pour améliorer la conductivité.

Diffraction neutronique

Toute matière irradiée par un faisceau de photons, d'électrons ou de neutrons émet dans toutes les directions un rayonnement de même énergie (ou d'énergie très voisine). C'est le phénomène de diffusion. Les raies de diffraction obtenues ont une position et une intensité en relation avec l'agencement des atomes au sein de l'échantillon, la largeur des raies de diffraction reflétant la taille moyenne des cristaux. Dans le cas de la diffraction neutronique, on tire parti de la grande pénétration des neutrons qui permet de prendre en compte l'ensemble de la masse de l'échantillon (par exemple, un calcul de dimension millimétrique) sans en altérer l'intégrité physicochimique. Dans la mesure où les phases chimiques contiennent majoritairement des éléments légers (H, O, N, C, Ca), la diffraction neutronique constitue dans cette indication un outil particulièrement adapté pour mesurer la taille des cristaux.

Apatites de calcium

Le tableau I montre clairement le caractère ubiquitaire des calcifications pathologiques constituées d'apatite. Cette ubiquité peut expliquer en partie la difficulté d'établir un lien significatif entre ces calcifications et une pathologie. De ce fait, si l'on prend le cas des calculs rénaux, qui sont en général multiphasiques, c'est la phase chimique qui accompagne l'apatite ou encore la teneur en carbonate de l'apatite qui permet de poser le diagnostic.

Ainsi, lorsque l'apatite s'accompagne de struvite, elle indique une infection urinaire à germes uréasiques. Si elle coexiste avec du phosphate amorphe de calcium ou de la whitlockite, cela évoque aussi une infection urinaire, mais cette fois à germes uréasiques ou non. Si l'apatite est associée à l'oxalate de calcium, elle oriente vers une hyper-calciurie, un diabète phosphaté, une anomalie de l'acidification urinaire ou encore une hyperparathyroïdie primaire. On retrouve une difficulté similaire pour le cancer du sein. Des microcalcifications constituées d'apatite ont été identifiées dans les glandes mammaires. Si elles s'associent le plus souvent à des lésions malignes, elles peuvent aussi s'observer pour des lésions bénignes [113].

Forme amorphe de l'apatite de calcium

L'apatite carbonatée peut se présenter sous une forme amorphe dénommée phosphates amorphes de calcium carbonatés (PACC). Plus précisément, les apatites biologiques sont des nanocristaux très réactifs, ayant à leur surface une couche hydratée responsable de leurs propriétés biologiques [78,114,115]. Sur le plan biochimique, il s'agit là d'une forme de précipitation rapide des phosphates calciques qui permet essentiellement de réduire une

sursaturation locale importante : par exemple, dans le cas de l'urine, une teneur élevée en PACC (> 20 %) sera très souvent la conséquence d'une infection.

La spectroscopie infrarouge constitue une technique de caractérisation classique en milieu hospitalier pour décrire la composition chimique des calcifications pathologiques [116]. Dans le cas des apatites, les différentes bandes d'absorption sont parfaitement assignées (figure 1A). Ainsi, les bandes ν_1 et ν_3 correspondant aux élongations de la liaison P-O sont observables respectivement à 960-962 cm^{-1} et 1035-1045 cm^{-1} alors que la déformation ν_4 O-P-O correspond au doublet 602-563 cm^{-1}. C'est un épaulement de la bande d'absorption n3 (1060 cm^{-1}) qui indique la présence de la phase amorphe.

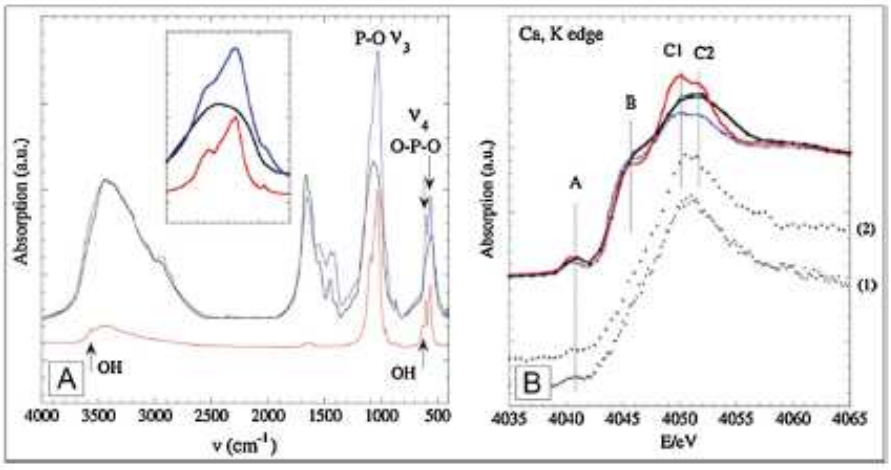

FIGURE 1
A et B. Caractérisation de l'apatite de calcium
A. Différents spectres infrarouges associés à une apatite cristallisée de synthèse (rouge), une apatite biologique de dimension nanométrique (bleu) ou amorphe (noir). B. Différents spectres d'absorption X associés à une apatite cristallisée (rouge), de dimension nanométrique (bleu) et amorphe (noir).

La caractérisation de cette phase peut s'effectuer également par spectroscopie d'absorption X qui est une technique spécifique au rayonnement synchrotron [117]. Elle est particulièrement adaptée aux matériaux ne possédant pas d'ordre à grande distance comme les agrégats métalliques ou les amorphes [118]. Cette spécificité rend compte du nombre important d'investigations structurales de composés biologiques basées sur cette spectroscopie [119–122]. Récemment, nous avons voulu connaître la nature et les proportions exactes des phases minérales présentes dans la plaque de Randall et apprécier sices proportions étaient modifiées lorsque l'on se déplace du sommet de la papille vers la médullaire profonde du rein. L'un des avantages de la spectroscopie d'absorption X par rapport à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est de pouvoir réaliser la mesure sans protocole de préparation susceptible d'altérer l'état physicochimique de l'échantillon i.e. sans affecter la teneur en eau de l'échantillon qui pilote la transition entre la phase apatite amorphe et la phase apatite nanocristalline. Sur la figure 1B, les structures C1 et C2 proviennent de l'existence dans l'apatite de deux sites cristallographiques distincts pour le calcium, présents dans un rapport 2/3 [112]. Lorsque l'on passe d'une apatite très bien cristallisée à une carbapatite biologique puis au PACC, il faut tenir compte des atomes de calcium présents en surface qui altèrent la séparation entre les deux composantes du doublet C1-C2 (figure 1B). Curieusement, la phase amorphe, souvent présente au côté de l'apatite, n'a pas été répertoriée dans le cas du cancer du sein [9]. En effet, dans cette pathologie, seules deux phases chimiques, l'apatite et la weddellite, ont été identifiées par spectroscopie infrarouge. Plus généralement, lorsque l'on

identifie au sein d'une calcification pathologique de l'apatite biologique, la présence de son précurseur devrait être discutée.

Teneur en carbonate

La teneur en carbonates des apatites biologiques a fait l'objet de nombreux travaux [123,124]. Pour la lithiase urinaire et le cancer du sein, elle a une signification clinique forte. Au niveau rénal, la teneur en carbonate des apatites présentes dans le calcul est faible, inhérente à des situations d'acidoses tubulaires ou à des causes métaboliques impliquant le calcium et/ou le phosphate. À l'opposé, les lithiases générées par uréolyse bactérienne ont des teneurs élevées en carbonate, presque toujours supérieures à 15 % (figures 2 et 3) [125].

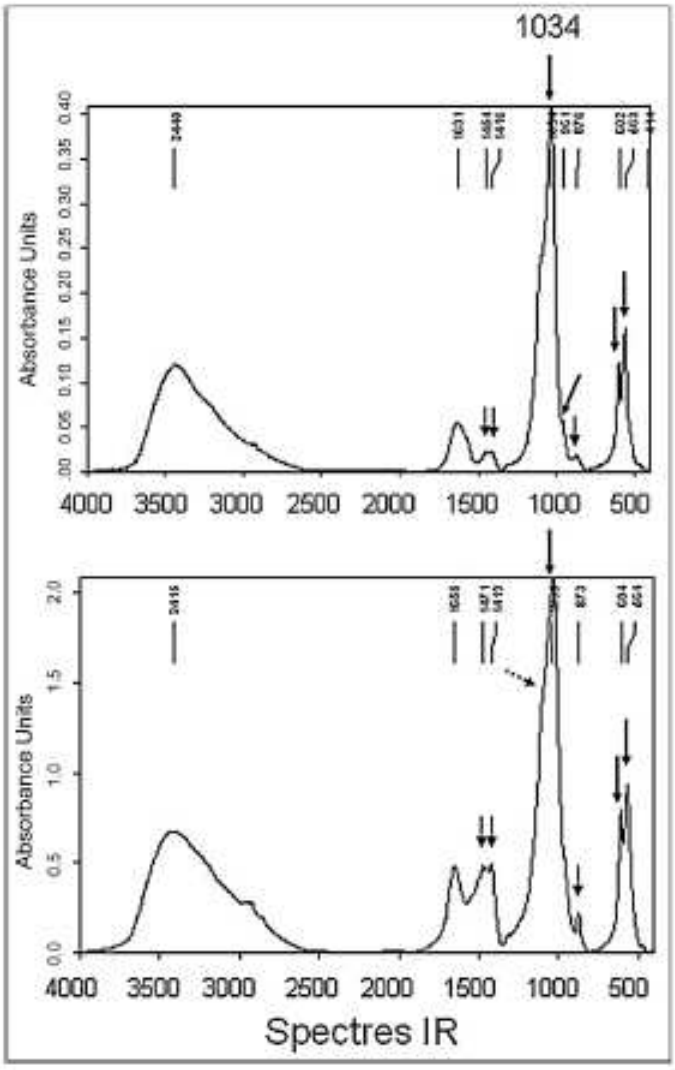

Figure 2. Origine biologique de la plaque de Randall et teneur en carbonate

La teneur en carbonate est appréciée par l'intensité relative des pics du groupement CO_3^{2-} observés entre 1415 et 1475 cm^{-1} et autour de 875 cm^{-1} par rapport à celle du pic du groupement PO_4^{3-} à 1035 cm^{-1}.

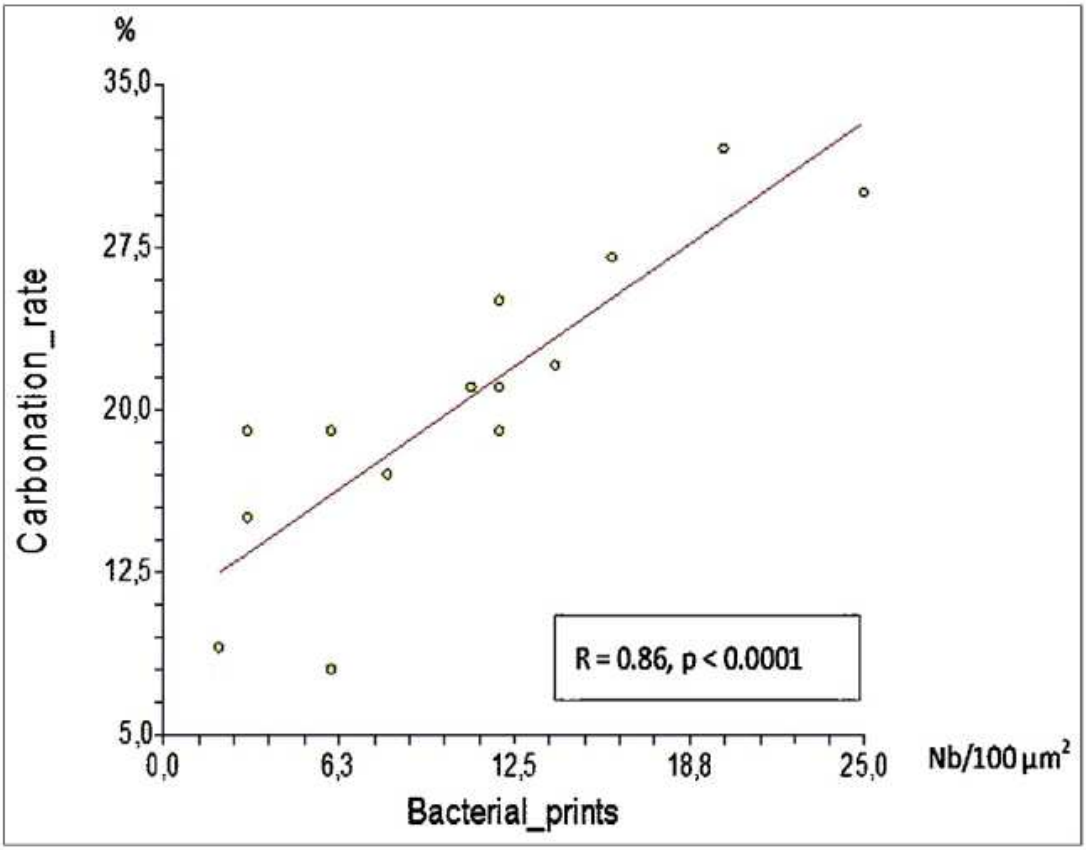

Figure 3. Relation entre teneur en carbonate de l'apatite et concentration en empreintes de bactéries dans les calculs d'origine infectieuse d'après [121].

Il est aussi possible d'utiliser la teneur en carbonate pour déterminer l'origine de la calcification. C'est le cas pour les plaques de Randall. Lorsqu'elle est élevée, la plaque est d'origine interstitielle alors que si elle est basse, elle évoque une origine urinaire (tubulaire).

Pour le cancer du sein, les travaux de Baker et al. [48] ont montré que la teneur en carbonate pouvait constituer une signature supplémentaire si l'on désirait faire la distinction entre lésions bénignes et malignes, le taux de carbonate étant plus faible en cas de tumeur cancéreuse.

Finalement, en ce qui concerne l'os, différents travaux portent sur une relation entre l'ostéoporose et la teneur en carbonate de l'apatite. L'analyse des spectres infrarouge peut, dans ce cas, tenir compte d'espèces peu discutées dans le cadre de la lithiase comme les groupements labiles CO_3^{-2}, HPO_4^{2-} et PO_4^{3-}. En fait, dans les calculs rénaux, plusieurs phases chimiques sont souvent présentes simultanément en raison de la plus grande variabilité du milieu urinaire comparativement au milieu intérieur. Les divers modes d'absorption de ces phases chimiques se superposent dans le spectre infrarouge, rendant plus complexe l'interprétation des spectres obtenus. Au niveau osseux, comme le rapportent Kourkoumelis et al. [126] dans une publication récente, la proportion des groupements labiles de l'apatite est modifiée significativement dans certains états pathologiques. En particulier, la teneur en

carbonate de l'apatite est influencée par l'état inflammatoire et la présence ou non d'une ostéoporose.

Ainsi, lorsque l'apatite est identifiée dans une calcification pathologique, la teneur en carbonates se doit d'être abordée. Pour ce faire, il convient de caractériser la calcification par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et non par une technique de diffraction X. En effet, les techniques de diffusion-diffraction [127] sont peu sensibles à ce paramètre physicochimique qui s'avère être un témoin très sensible aux conditions biochimiques pour plusieurs pathologies.

Teneur en éléments traces

Les apatites de calcium sont des composés dont la capacité à absorber (i.e. incorporer dans leur maille cristalline) ou adsorber (i.e. fixer à la surface des cristaux) des éléments traces est bien connue [128]. Sur le plan physiologique, la partie minérale du tissu osseux i.e. l'apatite sert de réservoir à différents éléments traces comme le zinc (Zn). De fait, il n'est pas étonnant que parmi les composés chimiques identifiés dans les calculs rénaux, les apatites soient associées aux teneurs en éléments traces les plus importantes (tableau II) [129].

TABLEAU II

Teneur moyenne en différents éléments des apatites présentes dans les calculs rénaux

	Fe (µg/g)	Cu (µg/g)	Zn (µg/g)	Se (µg/g)	Rb (µg/g)	Sr (µg/g)	Pb (µg/g)
CaOx	32	4	95	1,5	2	74	12
Apatite	44	7	1059	1	14	455	31
AU	6	1,5	4	0,3	0,1	4	0,8
Cystine	6	3	11	4	0,02	0,7	0,1

AU : acide urique ; CaOx : oxalate de calcium.

Cependant, il convient de souligner que des différences majeures existent selon l'origine de l'apatite. Ainsi, les apatites des plaques de Randall formées dans la médullaire profonde du rein, derrière l'épithélium papillaire, ont des teneurs en Zn 5 à 10 fois supérieures à celles observées dans les apatites issues des tubes rénaux qui forment les calculs (tableau III), suggérant le caractère inflammatoire de la plaque de Randall et la réaction tissulaire à la présence de ces calcifications considérées comme indésirables par le tissu rénal.

TABLEAU III

Teneur en zinc (Zn) des apatites présentes dans les plaques de Randall

Échantillons	Teneur en Zn (μg/g)
Apatite dans les calculs rénaux[1]	1059 ± 934
Plaque de Randall sur les calculs	
N4511	5056 ± 438
N7283	4677 ± 405
N10986	9948 ± 862
N20872	7939 ± 688
N26345	5559 ± 482
N29244	4572 ± 396
N42554	1903 ± 165

[1] Teneur moyenne en Zn dans la carbapatite d'un calcul rénal.

Structure à l'échelle mésoscopique

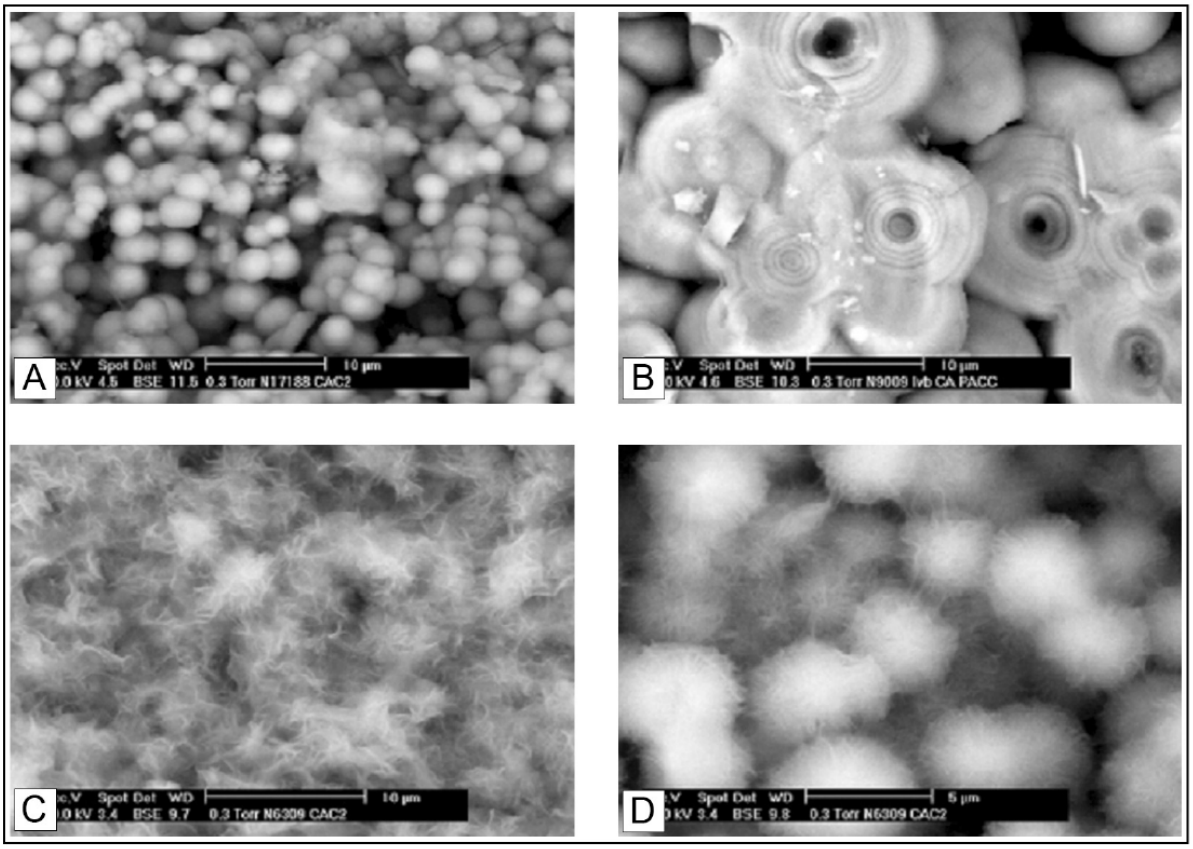

Figure 4 A à D. Différents aspects morphologiques des apatites biologiques observées dans des calculs rénaux (microscopie électronique à balayage)

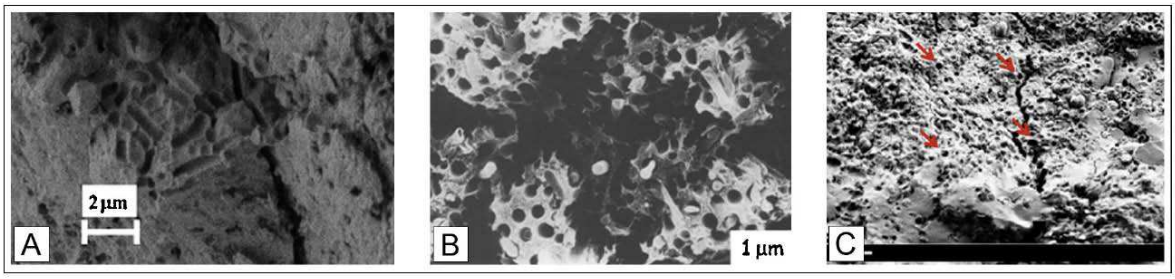

Figure 5 A à C. Images de calculs en microscopie électronique à balayage

A. Empreintes de bactéries observées à la surface d'un calcul rénal. B. Empreintes de bactéries observées à la surface d'un calcul biliaire. C. Empreintes de bactéries observées à la surface d'un calcul prostatique.

Les mesures de diffraction des rayons X ou de neutrons indiquent une isomorphie des apatites biologiques à l'échelle nanométrique [130] : ainsi, quelle que soit leur origine biologique, les nanocristaux qui les composent semblent avoir la même forme, les mêmes dimensions avec une direction de croissance privilégiée selon l'axe c (anisotropie) [131]. En revanche, à l'échelle mésoscopique (c'est-à-dire du micron), les apatites biologiques se présentent sous différentes structures dont quelques-unes sont illustrées sur la figure 4. La taille des sphères

(figure 4A), leur structure interne (concentrique en figure 4B), leur aspect diffus qui dépend, entre autres, de l'importance de la partie organique de la calcification (figure 4C et D) sont autant de caractéristiques morphologiques qui peuvent être modulées par la pathologie.

De plus, cette description à l'échelle mésoscopique permet de s'intéresser aux empreintes de bactéries qui peuvent exister à la surface de certaines calcifications pathologiques. La recherche de telles empreintes par microscopie électronique à balayage concerne plusieurs pathologies (figure 5). Dans le cas de la lithiase urinaire, différents travaux ont déjà notifié leur présence à la surface de calculs rénaux [132]. Nous avons récemment émis une explication fondée sur la taille des cristaux pour rendre compte de la présence d'empreintes de bactéries à la surface des calculs d'apatite et de leur absence lorsque le calcul est constitué de struvite bien que, dans ce cas, l'origine infectieuse soit évidente [133]. Plus précisément, dans le cas de calculs composés de struvite, c'est la morphologie des cristaux qui est modifiée par l'activité bactérienne [134]. D'autres types de travaux se sont focalisés sur le rôle des bactéries dans les pyélonéphrites [135].

Les calculs rénaux (figure 5A) ne sont pas les seules concrétions pour lesquelles des empreintes de bactéries ont été observées. Dans le cas des calculs biliaires « bruns », qui sont généralement de nature pigmentaire (figure 5B), la présence de bactéries a été mise en évidence par microscopie électronique à balayage [136,137]. De même, à la surface de calculs prostatiques, des empreintes de bactéries ont été observées (figure 5C). Dans une étude récente où cette recherche a été systématique à la surface de calculs prostatiques, nous avons constaté que des processus infectieux étaient associés à une proportion élevée de calculs prostatiques [25]. À noter que, sur le plan physicochimique, plusieurs travaux soulignent la possibilité de synthétiser de l'apatite par le biais d'une activité bactérienne [138].

Conclusion

La mise en perspective des différentes investigations dédiées aux calcifications pathologiques permet de définir une démarche expérimentale pour la caractérisation des paramètres physicochimiques pertinents. Ainsi, dans le cas où ces calcifications pathologiques sont composées d'apatite de calcium, il est nécessaire :

 d'apprécier la présence éventuelle de son précurseur amorphe ou d'autres phases chimiques par spectroscopie infrarouge ;

 d'évaluer le taux de carbonatation et, si possible, les différentes espèces de carbonate (labiles. . .) par spectroscopie infrarouge ;

 d'identifier par fluorescence X les éléments traces susceptibles d'être adsorbés ou piégés et éventuellement de procéder à des expériences de spéciation par spectroscopie d'absorption X afin de préciser leur état d'oxydation ;

 de décrire la surface à l'échelle mésoscopique afin d'établir la morphologie des cristallites et de relever la présence éventuelle d'empreintes de bactéries par microscopie électronique à balayage.

Cet ensemble de caractéristiques structurales définit en retour les techniques de caractérisation qu'il est nécessaire de combiner pour établir dans les meilleures conditions un lien avec la pathologie. L'opportunité de réaliser ces mesures à des échelles subcellulaires, grâce à l'émergence de nouveaux dispositifs expérimentaux spécifiques ou non aux grands instruments (centres de rayonnement synchrotron ou réacteurs nucléaires de recherche), catalyse de nouvelles investigations à cette interface physique-chimie-médecine. Cette démarche a déjà permis de proposer ce type de techniques de caractérisation comme outil de diagnostic d'autant plus précoce qu'elles sont capables de décrire la physicochimie des microcristaux [108].

Déclaration d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements : nous tenons à remercier tout particulièrement les Pr I. Brocheriou (hôpital Tenon), Dr X. Carpentier (hôpital de Nice), Dr C. Chappard (hôpital Lariboisière), Pr P. Conort (groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière), Dr P. Dorfmüller (groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière), Pr D. Hannouche (hôpital Lariboisière), Pr P. Jungers (hôpital Necker), Pr B. Knebelman (hôpital Necker), Dr E.-A. Korn (hôpital Lariboisière), Pr F. Lioté (hôpital Lariboisiere), Pr M. Mathonnet (hôpital de Limoges), Dr P. Méria (hôpital St-Louis), Dr C. Nguyen (hôpital Lariboisière), Dr J. Rode (hôpital Tenon), Dr I. Tostivint (groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière), Pr O. Traxer (hôpital Tenon) et Pr J.-C. Williams (Department of Anatomy and Cell Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, États-Unis) pour une série de discussions très informatives.

De plus, cette recherche dédiée aux calcifications pathologiques n'aurait pu aboutir sans le concours du Dr P.-A. Albouy (LPS), Dr G. André (LLB), Dr A. Bianchi (Inserm-U7561), Dr P. Chevallier (LURE), Dr A. Cousson (LLB), Dr P. Dumas (Synchrotron Soleil), Dr B. Fayard (LPS), Dr F. Fayon (CEHMTI), Dr E. Foy (laboratoire Pierre-Süe), Dr J. Frederick (Synchrotron Soleil), Dr J. Guicheux (laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire), Dr J.-L. Hazemann (ESRF), Dr A. Lebail (laboratoire des fluorures), Dr F. Le Naour (hôpital Paul-Brousse), Dr O. Mathon (ESRF), Dr G. Matzen (CEHMTI), Dr C. Mocuta (Synchrotron Soleil), Dr P. Reboul (UMR 7561), Dr M. Refringiers (Synchrotron Soleil), Dr S. Reguer (Synchrotron Soleil), Dr S. Rouzière (LPS), Dr J.-P. Samama (Synchrotron Soleil), Dr C. Sandt (Synchrotron Soleil), Dr D. Thiaudière (Synchrotron Soleil), Dr E. Véron (CEHMTI) and Dr R. Weil (LPS).

Cette recherche a été soutenue par les Instituts de physique et de chimie du CNRS ainsi que par une ANR blanche (ANR-09-BLAN-0120-02).

Références

[1] Daudon M, Traxer O, Jungers P. Lithiase urinaire, 2nd ed., Paris: Médecine-Sciences, Lavoisier; 2012.
[2] Daudon M, Réveillaud RJ, Jungers P. Piridoxilate-associated calcium oxalate urinary calculi: a new metabolic drug-induced nephrolithiasis. Lancet 1985;325:1338.
[3] Daudon M, Estepa L, Viard JP, Joly D, Jungers P. Urinary stones in HIV-1-positive patients t r e a t e d w i t h i n d i n a v i r . L a n c e t 1997;349:1294-5.
[4] Daudon M, Jungers P, Bazin D. Peculiar morphology of stones in primary hyperoxaluria. N Engl J Med 2008;359:100-2.
[5] Multigner L, Daudon M, Montalto G, Dee Caro A, Etienne JP, Sarles H. Radiolucent pancreatic stones. New Engl J Med 1986;314:248.
[6] Cariati A. Blackberry pigment (whitlockite) gallstones in uremic patient. Clin Res Hepatol Gastroenterol 2013;37(2):e69-72.http://dx.doi.org/10.1016 /j.clinre.2012.08.004.
[7] Biddle RJ, Arora S. Giant sialolith of the submandibular salivary gland. Radiol Case Rep 2008;3:2.
[8] Giachelli CM. Ectopic calcification, gathering hard facts about soft tissue mineralization. Am J Pathol 1999;154:671-5.
[9] Baker R, Matousek P, Ronayne KL, Parker AW, Rogers K, Stone N. Depth profiling of calcifications in breast tissue using picosecond Kerr-gated Raman spectroscopy. Analyst 2007;131:48-53.
[10] Holme TC, Reis MM, Thompson A, Robertson A, Parham D, Hickman P et al. Is mammographic microcalcification of biological significance? Eur Surg Oncol 1993;19:250-3.
[11] Mitre D, Kerebel B, Billet J. Étude de la phase minérale de la tumeur calcifiée de Malherbe.J Biol Buccale 1984;12:253-8.
[12] Rieu P. Infection lithiasis. Ann Urol 2005;39:16-29.
[13] Mannhardt W, Schumacher R. Progressive calcifications of lung and liver in neonatal herpes simplex virus infection. Pediatr Radiol 1990;21:236-7.
[14] Barbey F, Joly D, Rieu Ph, Méjean A, Daudon M, Jungers P. Medical treatment of cystinuria: critical reappraisal of long-term results. J Urol 2000;163:1419-23.
[15] Cochat P. Primary hyperoxaluria type 1. Kidney Int 1999;55:2533-47.
[16] Hoffmann M, Talaszka1 A, Bocquet JP, Le Monies de Sagazan H, Daudon M. Insuffisance rénale aiguë et 2,8-dihydroxyadéninurie. Nephrologie 2004;25:297-300.
[17] World Health Organization. Melamine-contaminated powdered infant formula in China; 2008, http://www.who.int/csr/don/2008_09_29a/en/index.html.
[18] Augusti M, Mikaelian JC, Monsaint H, Brin D, Daudon M. A silica urinary calculus secondary to the absorption of gelopectose in a child. Prog Urol 1993;3:812-5.
[19] Daudon M, Lacour B, Jungers P. High prevalence of uric acid calculi in diabetic stone formers. Nephrol Dial Transplant 2005;20:468-9.
[20] Daudon M, Jungers P. Diabetes and nephroli thiasis. Curr Diab Rep 2007;7:443-8.
[21] Moriyama H, Kanemura N, Brouns I, Pintelon I, Adriaensen D, Timmermans JP et al. Effects of aging and exercise training on the histological and mechanical properties of articular structures in knee joints of male rat. Biogerontology 2012;13:369-81.
[22] Jungers P, Daudon M, Leduc A. Lithiase urinaire. Paris: Ed. Médecine-Sciences, Flammarion; 1989.
[23] Jungers P, Daudon M, Conort P. Lithiase rénale, diagnostic et traitement. Paris: Ed. Médecine-Sciences, Flammarion; 1999.
[24] Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. Pediatr Nephrol 2010;25:831-41.
[25] Dessombz A, Méria P, Bazin D, Foy E, Rouziere S, Weil R et al. Infection and prostatic stones: evidence of a specific chemistry and bacterial imprints in calculi. PloS One 2012;(7):e51691 ([1–5]).
[26] Bazin D, Daudon M, Combes C, Rey C Characterization and some physicochemical aspects of pathological microcalcifications. Chem Rev 2012;112:5092-120.
[27] Bazin D, Daudon M. Pathological calcifications and other selected examples at the

medicine-solid state physics interface. J Phys D 2012;45:383001-10.
[28] Dessombz A, Bazin D, Dumas P, Sandt C, Sule-Suso J, Daudon M. Shedding light on the chemical diversity of ectopic calcifications in kidney tissues: diagnostic and research aspects. PloS One 2011;6:e28007 ([1–6]).
[29] Dessombz A, Méria P, Bazin D, Foy E, Rouziere S, Weil R et al. Diversite´ chimique des calculs prostatiques : une investigation par MEB et spectroscopie infrarouge. Prog Urol 2011;21:940-5.
[30] Dorfmüller P, Bazin D, Aubert S, Weil R, Brisset F, Daudon M et al. Crystalline ultrastructures, inflammatory elements, and neoangiogenesis are present in inconspicuous aortic valve tissue. Cardiol Res Pract 2010. http://dx.doi.org/10.4061/2010/685926 ([article ID 685926, 7 pages]).
[31] Ea HK, Nguyen C, Bazin D, Bianchi A, Guicheux J, Reboul P et al. Articular cartilage calcification in osteoarthritis insights into crystal-induced stress. Arthritis Rheum 2011;63:10-8.
[32] Bazin D, Daudon M, Chevallier P et al. Les techniques de rayonnement synchrotron au service de la caracte´ risation d'objets biologiques : un exemple d'application, les calculs re´ naux. Ann Biol Clin 2006;64:125-39.
[33] Méria P, Jungers P. Pyélite incrustante : un diagnostic précoce facilite la prise en charge conservatrice. Presse Med 2008;37:85-7.
[34] Bruyère F, Traxer O, Saussine C, Lechevallier E. Infection et lithiase urinaire. Prog Urol 2008;18:1015-20.
[35] Dent CC, Rose GA. Amino acid metabolism in cystinuria. Q J Med New Ser 1974;214:507-11.
[36] Rutchik SD, Resnick MI. Cystine calculi: diagnosis and management. Urol Clin North Am 1997;24:163-71.
[37] Nesterova G, Gahl WA. Cystinosis: the evolution of a treatable disease. Pediatr Nephrol 2013;28:51-9.
[38] Cherqui S, Sevin C, Hamard G, Kalatzis V, Sich M, Pequignot MO et al. Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. Mol Cell Biol 2002;22:7622-32.
[39] Gagné ER, Deland E, Daudon M, Noël LH, Nawar T. Chronic renal failure secondary to 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. Am J Kidney Dis 1994;24:104-7.
[40] De Jong DJ, Assmann KJM, De Abreu RA, Monnens LAH, van Liebergen FJHM, Dijkman HBP et al. 2,8 dihydroxyadenine stone formation in a renal transplant recipient due to adenine phosphoribosyltransferase deficiency. J Urol 1996;156:1754-5.
[41] Hoffmann M, Talaszka A, Bocquet JP, Le Monies de Sagazan H, Daudon M. Insuffisance rénale aiguë et 2,8-dihydroxyadéni- nurie. Nephrologie 2004;25:297-300.
[42] Stratta P, Fogazzi GB, Canavese C et al. Decreased kidney function and crystal depo- sition in the tubules after kidney transplant. Am J Kidney Dis 2010;56:585-90.
[43] Ulinski T, Sabot JF, Bourlon I, Cochat P. Bilateral urinary calculi after treatment with a silicate containing milk thickener. Eur J Pediatr 2004;163:239-40.
[44] Flythe, Rueda JF, Riscoe MK, Watnick S. Silicate nephrolithiasis after ingestion of supplements containing silica dioxide. Am J Kidney Dis 2009;54:127-30.
[45] Yarlagadda SG, Perazella MA. Drug-induced crystal nephropathy: an update. Expert Opin Drug Saf 2008;7:147-58.
[46] Herlitz LC, D'Agati VD, Markowitz GS. Crystalline nephropathies. Arch Pathol Lab Med 2012;136:713-20.
[47] Daudon M, Jungers P. Drug-induced renal calculi: epidemiology, prevention and management. Drugs 2004;64:245-75.
[48] Baker R, Rogers KD, Shepherd N, Stone N. New relationship between breast microcalcifications and cancer. Br J Cancer 2010;103:1034-9.
[49] Semins MJ, Lang E, Matlaga BR. Nephrocalcinosis. J Urol 2009;182:2910-1.
[50] Lazaro E, Etienne G, Mercier P, Longy-Boursier M. La néphrocalcinose : manifestation inaugurale d'un syndrome de Gougerot-Sjögren primitif. Rev Med Int 2003;24:745-7.

[51] Gupta RA, Udwadia FE, Agrawal P, Doctor N. Pancreatic glucagonoma with pancreatic calcification. Pancreatology 2013;13(3):327-9.
[52] Lehto LJ, Sierra A, Corum CA, Zhang J, Idiyatullin D, Pitkänen A et al. Detection of calcifications in vivo and ex vivo after brain injury in rat using SWIFT. NeuroImage 2012;61:761-72.
[53] Gallagher R, Schafer G, Redick M, Inciradi M, Smith W, Fan F et al. Microcalcifications of the breast: a mammographic-histologic cor- relation study using a newly designed Path/ Rad Tissue Tray. Ann Diagn Pathol 2012;16:196-201.
[54] Nisbet AP, Borthwick-Clarke A, Scott N. gauge vacuum assisted directional biopsy of breast calcifications, using upright stereotactic guidance. Eur J Radiol 2000;36:144-6.
[55] Kim SM, Park JM, Moon WK. Dystrophic breast calcifications in patients with collagen diseases. Clin Imaging 2004;28:6-9.
[56] Mishima H, Yamamoto H, Sakae T. Scanning electron microscopy – energy dispersive spectroscopy and Xray diffraction analyses of human salivary stones. Scanning Microsc 1992;6:487-94.
[57] Roosens B, Bala G, Droogmans S, Hostens J, Somja J, Delvenne E et al. Occurrence of cardiovascular calcifications in normal, aging rats. Exp Gerontol 2012;47:614-9.
[58] LeGeros RZ. Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification. Z Kardiol 2001;90:116-24.
[59] Pugashetti R, Shinkai K, Ruben BS, Grossman ME, Maldonado J, Fox LP. Calcium may preferentially deposit in areas of elastic tissue damage. J Am Acad Dermatol 2011;64:296-301.
[60] Le Naour F, Sandt C, Peng C, Trcera N, Chiappini F, Flank AM et al. In situ chemical composition analysis of cirrhosis by combining synchrotron fourier transform infrared and synchrotron X-ray fluorescence microspectroscopies on the same tissue section. Anal Chem 2012;84:10260-6.
[61] Sfanos KS, Wilson BA, De Marzo AM, Isaacs WB. Acute inflammatory proteins constitute the organic matrix of prostatic corpora amylacea and calculi in men with prostate cancer. PNAS 2009;106:3443-8.
[62] Chan ED, Morales DV, Welsh CH, McDermott MT, Schwarz MI. Calcium deposition with or without bone formation in the lung. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1654-69.
[63] Poggi SH, Bostrom KI, Demer LL, Skinner HC, Koos BJ. Placental calcification: a metastatic process? Placenta 2001;22:591-6.
[64] Contiguglia SR, Alfrey AC, Miller NL, Runnells DE, Le Geros RZ. Nature of soft tissue calcification in uremia. Kidney Int 1973;4:229-35.
[65] LeGeros RZ, Contiguglia SR, Alfrey AC. Pathological calcifications associated with uremia. Two types of calcium phosphate deposits. Calcif Tissue Res 1973;13:173-85.
[66] Rosen F, McCabe G, Quach J, Solan J, Terkeltaub R, Seegmiller JE et al. Differential effects of aging on human chondrocyte responses to transforming growth factor beta: increased pyrophosphate production and decreased cell proliferation. Arthritis Rheum 1997;40:1275-81.
[67] Lee RS, Kayser MV, Ali SY. Calcium phosphate microcrystal deposition in the human intervertebral disc. J Anat 2006;208:13-9.
[68] Katsamenis OL, Karoutsos V, Kontostanos K, Panagiotopoulos EC, Papadaki H, Bouropoulos N. Microstructural characterization of CPPD and hydroxyapatite crystal depositions on human menisci. Cryst Res Technol 2012;47:1201-9.
[69] Tsujii A, Tanaka Y, Yonetani Y, Iuchi R, Shiozaki Y, Horibe S. Symptomatic calcification of the anterior cruciate ligament: a case report. Knee 2012;19:223-5.
[70] Zelentsov EL, Moroz TN, Kolmogorov YP, Tolmachev VE, Dragun GN, Palchik NA et al. The elemental SRXRF analysis and mineral composition of human salivary stones. NIM A 2001;470:417-21.
[71] Boschin F, Boutigny H, Delcourt-Debruyne E. Maladies gingivales induites par la plaque. EMC Dentisterie 2004;1:462-80.
[72] Lagier R, Baud CA. Magnesium Whitlockite, a calcium phosphate crystal of special interest in p a t h o l o g y . P a t h o l R e s P r a c t 2003;199:329-35.
[73] Lee JS, Morrisett JD, Tung CH. Detection of hydroxyapatite in calcified cardiovascular tissues. Atherosclerosis 2012;224:340-7.

[74] Van Meerssche M, Feneau-Dupont J. Introduction à la cristallographie et à la Chimie Structurale. Louvain, Cesson: Vander; 1973.
[75] Livage J, Sanchez C. Sol-gel chemistry. J Non Crystalline Solids 1992;145:11-9.
[76] Randall A. An hypothesis for the origin of renal calculus. N Engl J Med 1936;214:234-7.
[77] Daudon M, Traxer O, Jungers P, Bazin D. Stone morphology suggestive of Randall's plaque. In: Evan AP, Lingeman JE, Williams Jr JC, editors. Renal stone disease, vol. 900. Melville, New York: American Institute of Physics Conference Proceedings; 2007 . p. 26-34.
[78] White TJ, Zhi Li D. Structural derivation and crystal chemistry of apatites. Acta Cryst B 2003;59:1-16.
[79] Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam: Elsevier; 1994.
[80] Rey C, Combes C, Drouet C, Sfihi H, Barroug A. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: implications for biominerals and biomaterials . Mater Sci Eng 2007;27:198-205.
[81] Cohen AM, Maxon HR, Goldsmith RE, Schneider HJ, Wiot JF, Loudon RG et al. Metastatic pulmonary calcification in primary hyperpara- thyroidism. Arch Intern Med 1977;137:520-2.
[82] Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS. Identifying differences in microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy. Cancer Res 2002;62:5375-80.
[83] Mitsuyama H, Healey RM, Terkeltaub RA, Coutts RD, Amiel D. Calcification of human articular knee cartilage is primarily an effect of aging rather than osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 2007;15:559-65.
[84] Klein CPAT, De Groot K, Driessen AA, van des Lubbe HBM. Interaction of biodegradable beta-whitlockite ceramics with bone tissue: an in vivo study. Biomaterial 1985;6:189-92.
[85] Semmelink JM, Klein CPAT, Vermeiden JPW, Althuis AL. Granuloma and plasma cell formation induced by the subcutaneous implantation of beta-whitlockite particles. Biomaterial 1986;7:152-4.
[86] Ea HK, Uzan B, Rey C, Lioté F. Octacalcium phosphate crystals directly stimulate expression of inducible nitric oxide synthase through p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in articular chondrocytes. Arthritis Res Ther 2005;7:R915-26.
[87] Nguyen C, Lieberhee M, Bordat C, Velard F, Côme D, lioté F et al. Intracellular calcium oscillations in articular chondrocytes induced by basic calcium phosphate crystals lead to cartilage degradation. Osteoarthritis Cartilage 2012;20:1399-408.
[88] Velard F, Braux J, Amedee J, Laquerriere P. Inflammatory cell response to calcium phosphate biomaterial particles: an overview. Acta Biomater 2013;9:4956-63.
[89] Escobar C, Byer KJ, Khaskheli H, Khan SR. Apatite induced renal epithelial injury:insight into the pathogenesis of kidney stones. J Urol 2008;180:379-87.
[90] Giachelli CM. Ectopic calcification: new concepts in cellular regulation. Z Kardiol 2001;90:31-7.
[91] Sayers DE, Stern EA, Lytle F. New technique for investigating noncrystalline structures: Fourier analysis of the extended X-ray-absorption fine structure. Phys Rev Lett 1971;27:1204-7.
[92] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. Phys Rev Lett 1986;56:930-3.
[93] Duncan W, Williams GP. Infrared synchrotron radiation from electron storage rings. Appl Opt 1983;22:2914-23.
[94] Kaiser J, Hola M, Galiova M, Novotny K, Kanicky V, Martinec P et al. Investigation of the microstructure and mineralogical composition of urinary calculi fragments by synchrotron radiation X-ray microtomography: a feasibility study. Urol Res 2011;39:259-67.
[95] Laurencin D, Smith ME. Development of 43Ca solid state NMR spectroscopy as a probe of local structure in inorganic and molecular materials. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc 2013;68:1-40.
[96] Nikel O, Laurencin D, Bonhomme C, Sroga GE, Besdo S, Lorenz A et al. investigation of intact human bone quality: balancing issues and insight into the structure at the organic – mineral interface. J Phys Chem C 2012;116:6320-31.
[97] Gazi E, Dwyer J, Lockyer N, Gardner P, Vickerman JC, Miyan J et al. The combined

application of FTIR microspectroscopy and ToF-SIMS imaging in the study of prostate cancer. Faraday Discuss 2004;126:41-59.
[98] Dazzi A, Policar C. FM-IR: photothermal infrared nanospectroscopy: application to cellular imaging. In: Biointerface characterization by advanced IR spectroscopy. Ed. Elsevier; 2011.
[99] Suortti P, Thomlinson W. Medical applications of synchrotron radiation. Phys Med Biol 2003;48:R1-35.
[100]McRae R, Bagchi P, Sumalekshmy S, Fahrni CJ. In situ imaging of metals in cells and tissues. Chem Rev 2009;109:4780-827.
[101]Dumas P, Jamin N, Teillaud JL, Miller LM, Beccard B. Imaging capabilities of synchrotron infrared microspectroscopy. Faraday Discuss 2004;126:289-302.
[102]Kacakova S, Maigre L, Chevalier J, Réfrégiers M, Page JM. Antibiotic transport in resistant bacteria: synchrotron UV fluorescence microscopy to determine antibiotic accumulation with single cell resolution. PLoS One 2012;7:e38624.
[103]Pallu S, Rochefort GY, Jaffre C, Refregiers M, Maurel CB, Benaitreau D et al. Synchrotron ultraviolet microspectroscopy on rat cortical bone: involvement of tyrosine and tryptophan in the osteocyte and its environment. PLoS One 2012;7:e43930.
[104]Wu B, Becker JS. Imaging of elements and molecules in biological tissues and cells in the low-micrometer and nanometer range. Intern J Mass Spectrom 2011;307:112-22.
[105]Fayard B, Salomé M, Takemoto K, Kihara H, Susini J. Some practical considerations about the effects of radiation damage on hydrated cells imaged by X-ray fluorescence microscopy. J Electron Spectrosc Relat Phenomena 2009;170:19-24.
[106]Lewis RA. Medical applications of synchrotron radiation in Australia. NIM A 2005;548:23-9.
[107]Pelka JB. Biomedical facility for the future Polish synchrotron light source. Radiat Phys Chem 2009;78:S142-8.
[108]Sun Z. The promise of synchrotron radiation in medical science. Aust Med J 2009;1(5):1-5.
[109]Margaritondo G, Hwu Y, Je JH. Synchrotron light in medical and materials science radiology. Riv Nuovo Cimento 2004;27:1-40.
[110]http://lewebzine.aphp.fr/diagnostiquer-tot-pour-eviter-la-greffe-du-rein/.
[111]Current events. J Synchrotron Radiat 2007;14:297–8.
[112]Bazin D, Daudon M, Chappard C, Rehr JJ, Thiaudière D, Reguer S. The status of strontium in biological apatites: an XANES investigation. J Synchrotron Radiat 2011;18:912-8.
[113]Morgan MP, Cooke MM, McCarthy GM. Microcalcifications associated with breast cancer: an epiphenomenon or biologically significant feature of selected tumors? J M a m m a r y G l a n d B i o l N e o p l a s i a 2005;10:181-7.
[114]Cazalbou S, Eichert D, Droue C, Combes C, Rey C. Minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium. C R Palevol 2004;3:563-72.
[115]Combes C, Rey C. Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials. Acta Biomater 2012;6: 3362-78.
[116]Estépa L, Daudon M. Contribution of F.T.I.R. spectroscopy to the identification of urinary stones and kidney crystal deposits. Biospectroscopy 1997;3:347-69.
[117]Lytle FW, Sayers DE, Stern EA. Exafs technique II. Experimental practice and selected results. Phys Rev B 1975;11:4825-35.
[118]Bazin D, Sayers D, Rehr J. Comparison between Xas, Awaxs, Asaxs and Dafs applied to nanometer scale metallic clusters. J Phys Chem B 1997;101:11040-7.
[119]Eichert D, Salomé M, Banu M, Susini J, Rey C. Preliminary characterization of calcium chemical environment in apatitic and non- apatitic calcium phosphates of biological interest by XAS. Spectrochim Acta B 2005;60:850-8.
[120]Eichert D, Gregoratti L, Kaulich B, Marcello A, Melpignano P, Quaroni L et al. Imaging with spectroscopic micro-analysis using synchrotron radiation. Anal Bioanal Chem 2007;389:1121-32.
[121]Carpentier X, Bazin D, Jungers P, Reguer S, Thiaudière D, Daudon M. The pathogenesis of Randall's plaque: a papilla cartography of Ca compounds through an ex vivo investigation

based on XANES spectroscopy. J Synchrotron Radiat 2010;17:374-9.
[122]Eichert D, Salome M, Bleuet P, Bohic S, Susini J.In: Contribution of X-ray microscopy to bone mineral studies; 2008.p. 210-2 (vol. 7).
[123]Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson RI, Glimcher MJ. The carbonate environment in bone mineral. A resolution enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study. Calcif Tissue Int 1989;45:157-64.
[124]Astala R, Stott MJ. First principles investigation of mineral component of bone: CO3 substitutions in hydroxyapatite. Chem Mater 2005;17:4125-33.
[125]Carpentier X, Daudon M, Traxer O et al. Relationships between carbonation rate of CA and morphologic characteristics of Ca phosphate stones and etiology. Urology 2009;73:968-75.
[126]Kourkoumelis N, Lani A, Tzaphlidou M. Infrared spectroscopic assessment of the inflammation-mediated osteoporosis (IMO) model applied to rabbit bone. J Biol Phys 2012;38:623-35.
[127]Guinier A. Théorie et technique de la radiocristallographie. Dunod: Paris; 1964.
[128]Sneddon IR, Orueetxebarria M, Hodson ME, Schofield PF, Valsami-Jones E. Use of bone meal amendments to immobilise Pb, Zn and Cd in soil: a leaching column study. Environ Pollut 2006;144:816-25.
[129]Bazin D, Chevallier P, Matzen G, Jungers P, Daudon M. Heavy elements in urinary stones. Urol Res 2007;35:179-84.
[130]Bazin D, Chappard C, Combes C et al. Diffraction techniques and vibrational spectroscopy opportunities to characterise bones. Osteoporosis Int 2009;20:1065-73.
[131]Vallet-Reg M, Gonzalez-Calbet MJ. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. Prog Solid State Chem 2004;32:1-31.
[132]Cifuentes Delatte L, Santos M. Calcified bacteria in renal stones: electron microscopic aspects. Eur Urol 1977;3:96-9.
[133]Bazin D, André G, Weil R, Matzen G, Véron E, Carpentier X et al. Absence of bacterial imprints on struvite kidney stones. A structural investigation at the mesoscopic and atomic scale. Urology 2012;79: 786-90.
[134]Prywer J, Torzewska A, Pocinski T. Unique surface and internal structure of struvite crystals formed by Proteus mirabilis. Urol Res 2012;40:699-707.
[135]Braude AI, Siemienski J. Role of bacterial urease in experimental pyelonephritis. J Bacteriol 1960;80:171-9.
[136]Leung JWC, Sung JY, Costerton JW. Bacteriological and electron microscopy examination of brown pigment stones. J Clin Microbiol 1989;27:915-21.
[137]Stewart L, Oesterle AL, Erdan I, Griffiss JM, Way LW. Pathogenesis of pigment gallstones in Western societies: the central role of bacteria. J Gastrointest Surg 2002;6:891-904.
[138]Lucas J. Prévôt. Synthèse de l'apatite par voie bactérienne à partir de matière organique phosphatique et de divers carbonates de calcium dans des eaux douce et marine naturelles. Chem Geol 1984;42:101-18.