

Myosite ossifiante circonscrite

Étude histochimique et ultrastructurale d'une observation

T. CAULET, J. J. ADNET, M. PLUOT, J. GOUGEON et C. HOPFNER
Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Faculté de Médecine, Reims, France

Reçu Janvier 20, 1969

Histochemical and Ultrastructural Studies of one Case of Myositis Ossificans Circumscripta

Summary. The authors report a study of myositis ossificans circumscripta in a 62 year old man. The histopathology is briefly described; the histochemistry, histoenzymology and ultrastructure of the 3 types of ossification seen in this lesion (membranous, enchondral and osteoblastic ossification), are reported in detail. The reactions for proteins were positive, and especially those for non-sulfated and sulfated acid M.P.S., and for alkaline phosphatase, esterase, dehydrogenase and leucine-aminopeptidase, in the ossifiable connective matrix. The A.T.P.ase activity was much stronger within the mineralized area of the bone. The conditions of the ossification appeared to be normal, but the ultrastructural study revealed an abnormal character of the collagen of the ossifiable mesenchyme. The collagen fiber was short, its period of 280 to 350 Angstroms, indicating a structural modification, which is possibly genetic and familial in origin. Such a factor may account for the pathological ossification.

Résumé. Les auteurs rapportent une observation de myosite ossifiante circonscrite primitive chez un homme de 62 ans. Après un bref rappel sur l'aspect histopathologique, ils étudient l'histochimie, l'histoenzymologie et l'ultrastructure des 3 types d'ossification rencontrés dans cette lésion (ossification membraneuse, ossification enchondrale, ossification ostéoblastique). Outre l'importance de la positivité des réactions pour les protéines, il faut souligner celle des M.P.S. acides sulfatés et surtout non sulfatés, de l'activité phosphatasique alcaline, estérasique, déshydrogénasique et leucine-amino-peptidasique, au niveau de la matrice conjonctive ossifiable, l'activité A.T.P.ase étant plus grande au niveau de la zone de minéralisation de l'os. Les conditions d'ossification sont sensiblement identiques à celles de l'os normal, mais l'étude ultrastructurale précise le caractère anormal du collagène du mésenchyme ossifiable: celui-ci est un collagène court dont la période est de 280 à 350 Angstroms. Ce fait constitue une modification de structure — dont l'origine génétique et familiale possible est évoquée — qui pourrait être l'un des facteurs responsables de l'ossification pathologique.

Nous avons observé un cas de myosite ossifiante circonscrite que nous avons pu étudier par les méthodes histochimiques, histoenzymologiques et au point de vue ultrastructural. Les problèmes d'histogénèse de cette affection, interférant avec les différents mécanismes d'ossification rencontrés dans l'organisme, justifient l'intérêt d'une telle étude.

Observation

Il s'agit d'un homme de 62 ans, chez lequel apparaît sans aucun facteur déclenchant et en particulier sans aucun traumatisme, un gonflement douloureux de la face interne de la cuisse droite (Dr. LABRAM-CHÂLONS). La face interne de la cuisse droite est en effet le siège d'une tuméfaction, profonde, étendue selon l'axe du membre, développée en pleine masse musculaire. Elle est mal limitée et nettement sensible à la palpation. Une intervention est pratiquée en

Novembre 1967 (Dr. DOUSSET); une masse étendue sur 18 à 20 cm et occupant le corps charnu du muscle vaste interne, accolée à l'os, mais indépendante de lui, est réséquée en sectionnant le muscle au-dessus et au-dessous de la zone indurée.

Matériel et méthodes

L'examen a porté sur plusieurs fragments prélevés en différents territoires périphériques les moins calcifiés, dans la masse d'exérèse, à fin d'études histologiques, histo-chimiques, histo-enzymologiques et ultrastructurales. Plusieurs fixations et techniques ont été appliquées:

— après fixation au Bouin Hollande ou au formol neutre, suivie ou non de décalcification rapide à l'E.D.T.A. à 6% et inclusion en paraffine, étude par colorations usuelles.

— étude des acides nucléiques, des protéines, des hydrates de carbone (glycogène, muco-substances acides et non acides — GABE, 1968) — sur coupes en congélation et en paraffine.

— coupes au Cryostat sur fragments non fixés, congelés dans l'azote liquide sans décalcification ou après décalcification rapide à l'E.D.T.A. à 6% à pH 6.

Dans l'ensemble, les techniques appliquées ont été celles préconisées essentiellement par BARKA et ANDERSON (1963): phosphatases acides et alcalines, A.T.P.ases, 5 nucléotidases, estérases (alpha-naphtyl-estérase), leucine amino-peptidase, bêta-glycuronidase, peroxydases, cytochrome-oxydase, diverses déshydrogénases: succinique-déshydrogénase (S.D.H.), D.P.N.H. diaphorase.

— Un fragment après fixation à la glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium a été inclus dans l'Epon sans décalcification et examiné au Microscope électronique Siemens Elmiskop 1A. et JEM T7.

Résultats

1. L'examen anatomo-pathologique

montre au point de vue macroscopique une masse enchâssée en plein muscle strié.

Histologiquement, il s'agit d'un aspect typique de myosite ossifiante: cette lésion comporte:

— des zones de néogénèse osseuse d'origine conjonctive (Fig. 1) (métamorphisme), formant un os fibreux ou immature au niveau duquel la polarisation après imprégnation de la réticuline permet de reconnaître une structure fibrillaire biréfringente assez grossière qui se poursuit dans le conjonctif voisin sous forme de travées; cette fibrose, fait important, respecte les fibres musculaires qui néanmoins la dirigent et qui s'atrophient concurremment. Les fibroblastes, par une transformation ostéo-progénitrice (YOUNG, 1962), deviennent directement les cellules des travées osseuses; l'épaississement réticulinique inter-cellulaire ainsi que la transformation de la substance fondamentale, sont manifestes.

— des zones de néogénèse cartilagineuse directe (Fig. 2), par foyers périphériques (métamorphisme chondroïde du conjonctif avec métamorphose chondrocytaire); les fibres conjonctives polarisant la lumière ainsi que la réticuline s'y perdent et disparaissent. Le cartilage dans la zone hypertrophique se minéralise.

— des zones d'ossification enchondrale, en périphérie des nodules cartilagineux.

— des zones d'ossification ostéoblastique avec dépôts d'une couche ostéoïde qui se minéralise ensuite.

— des zones de lyse, accompagnant la limitation du processus en périphérie et le remaniement des travées osseuses.

La chondrolyse est en partie chondroclastique, des amas de cellules plasmodiales s'accumulant dans des lacunes sur des massifs cartilagineux effrités; souvent cependant des petits bouquets vasculaires apparaissent au contact direct du cartilage et de chondrocytes dégénératifs ou hypertrophiques. L'ostéolyse est ici surtout de type ostéoclastique. La lyse d'origine vasculaire paraît modérée. La résorption ostéocytaire est absente.

2. Étude histochimique

a) *Lipides*. Ils sont à peu près absents en dehors de quelques grains noir soudan B positifs en congélation, au niveau de chondrocytes. Par ailleurs le noir soudan B, sur coupes en paraffine est positif en périphérie de certains chondrocytes.

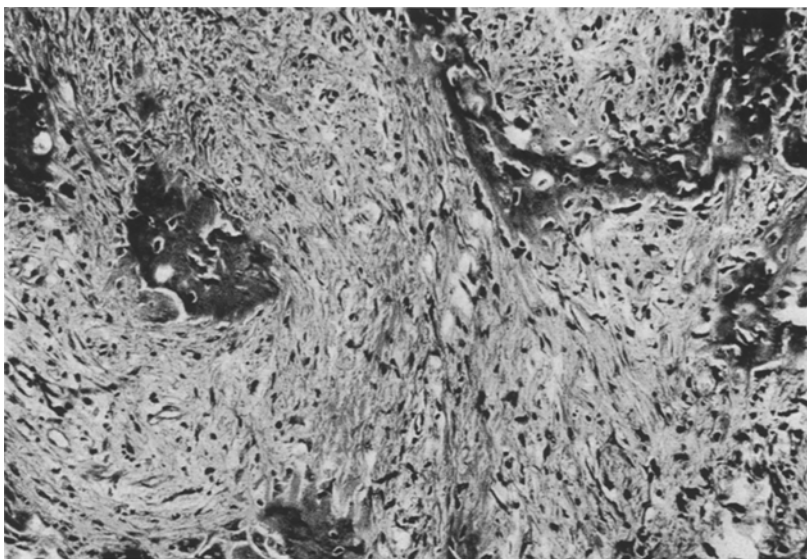


Fig. 1. Zone de condensation fibrillaire inter-trabéculaire (ossification de membrane). Col. H.P.S. \times env. 110

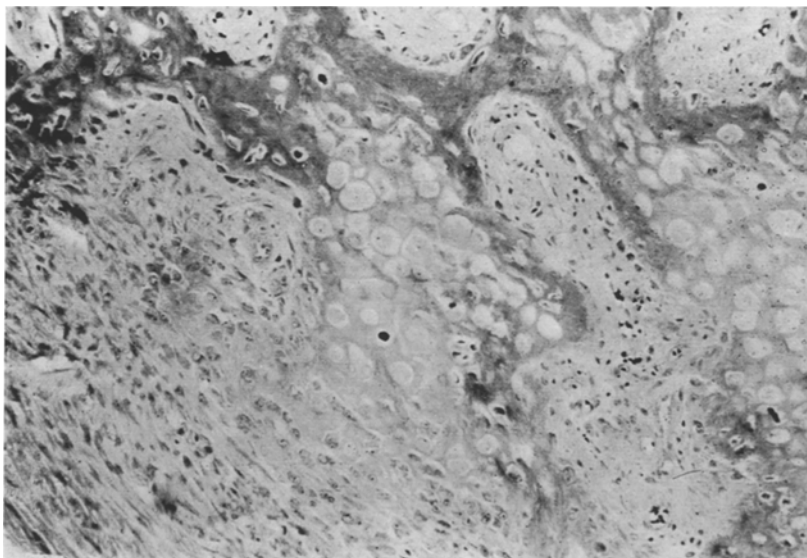


Fig. 2. Zone périphérique de chondrogénèse conjonctive avec ossification «enchondrale». (Col. Hématoxy. Phosphotungst. \times env. 110)

b) Protides; acides nucléiques. La positivité du cytoplasme à la galloxyanine et à la pyronine, est surtout marquée sur les ostéoblastes et les ostéoclastes ainsi que plus modérément, sur les fibroblastes en voie de métamorphose ostéocytaire.

L'intensité des colorations signalétiques du conjonctif (bleu de bromophénol, H.P.T.A. de Mallory) et des réactions des groupes alpha-aminés libres est manifeste sur le conjonctif

Tableau 1. *Detection des mucosubstances. Elements tissulaires*

Materiel identifié	Matrice conjonctive d'ossifi- cation	Conjonctif medull. et inactif	Zones chondro- ides	Zones en ossific. metamorph.	Zones d'ossific. enchondrale	Osteoïde	Os	Cartilage	Cartilage hyper- trophique
Mucosubstances neutres	+ ou + +	- ou +	+	+	+	+	+	- ou + + (PC)	-
Mucosubstances acides									
a) sulfatées	± ou +	-	+	±	-	-	-	+	+
b) non sulfatées	+ + + (en partie ac. hyal.)	-	+	+	+	(Zone para- ostéoblast. + +)	+	+	+
							(en partie acide hyalu.)	+	(en partie acide hyalu.)

Les réactions sont notées, suivant leur intensité, de - à + + + + +. PC = Périphérie chondrocytaire.

Tableau 2. *Détection des*

Elements	Enzymes			
	Phosphat alcalines	Phosphat acides	A.T. Pases	5 nucléotidases
Cellules musculaires normales	—	—	++	++
altérées	—	—	—	—
Cellules conjonctives actives	+ ou ++	++	+	+
Ostéoblastes	++ à +++	+	+++	±
Ostéocytes	— ou ++	+	++	+
Ostéoclastes	±	++++	—	±
Chondroblastes et chondrocytes en prolifération	±	±	++	±
Chondrocytes hypertrophiques et dégénératifs	+ à ++	± ou ++	—	±
Substance ossifiable et ostéoïde	++++	++	+ à ++	—
Substance minéralisée ou en voie de minéralisation	±	—	++++	++
Autres substances	zones de résorpt. oss. ± cart. ± à + capil. ++	zones de lyse ++ cartil. + à ++	capil. ++ conj. +	os + ostéolyse ++

fibrillaire ossifiable et chondrifiable, l'os mature, les ostéoblastes et les ostéoclastes mais non sur l'ostéoïde, la substance cartilagineuse.

La substance osseuse paraît surtout contenir des groupes S.H., le conjonctif ossifiable et le cartilage étant plutôt riches en groupes S.S.

c) *Hydrates des carbone* (Tableau 1).

— le glycogène, très peu abondant dans les ostéoclastes et les ostéoblastes, devient plus abondant dans les chondrocytes en voie d'hypertrophie, dans les éléments dégénératifs ainsi que dans la zone de lyse adjacente (glycophanérèse).

— les mucosubstances neutres (glycoprotéines) et acides sont abondantes. Le tissu ossifiable et la substance fondamentale cartilagineuse en zone proliférative sont particulièrement riches en muco-substances neutres.

L'acide hyaluronique paraît être un des constituants des mucosubstances acides. Dans certaines zones cartilagineuses hypertrophiques, les M.P.S. acides sulfatés ou phosphorés sont pratiquement seuls présents.

d) *distribution des enzymes* (Tableau 2). Les déshydrogénases et en particulier la D.P.N.H. diaphorase (Fig. 3) sont abondantes dans les éléments actifs.

— les phosphatases acides (Fig. 4) existent en quantité très importante dans les ostéoclastes et les chondroclastes et les zones de lyse, moins dans les ostéoblastes, et pratiquement pas dans les ostéocytes. Elles apparaissent aussi dans la substance ossifiable.

Parmi les enzymes étudiés il faut surtout insister sur les phosphatases alcalines (Fig. 5) qui existent en quantité importante dans les ostéoblastes, la bordure ostéoïde et les fibroblastes, principalement dans les zones actives.

activités enzymatiques

Enzymes						
Estérases	L. A. P.	S. D. H.	D. P. N. H.	B. Glycu- ronidases	Cyto- chrome- oxydase	Peroxy- dases et pseudo P.
++	+++	+++	++	+	—	++
±	—	±	±	+	—	—
+++	±	±	+	+	—	—
+++	+++	+	+++	++	++	—
++	++	±	++	+	—	—
++++	++	+++	++++	+++	++	±
+	+	±	+++	+	+	—
—	+	±	++	±	±	—
(fin liseré ostéoïde)	+	+++	—	—	—	±
+	+++	—	—	—	—	+
+				ossif. en- chondrale ++	conj. med. ++ Os —	—

Les A.T.P.ases (Fig. 6) sont présentes dans les fibres musculaires normales. Ici encore les zones ossifiables sont positives surtout au niveau du tissu en voie de minéralisation (versant osseux de l'ostéoïde).

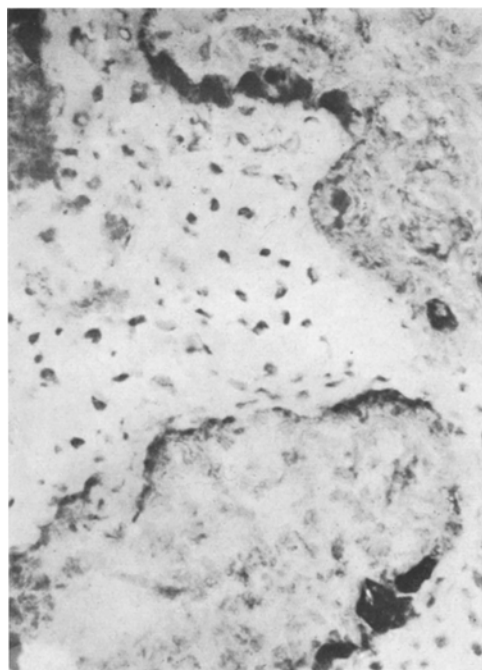
3. Étude ultrastructurale

Les colorations pratiquées ont été l'Uranyl simple, Uranyl-plomb, coloration par l'acide phosphotungstique. En outre, la détection des phosphatases acides et alcalines a été réalisée selon les techniques de Gomori.

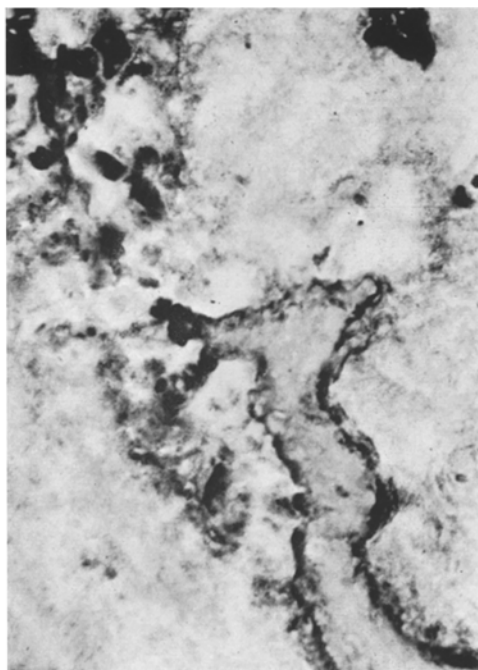
4. Résultats

L'observation a été effectuée après repérage soigneux sur des coupes semi-fines colorées par le bleu de Toluidine et par la réticuline.

1. Le muscle montre des images caractéristiques d'altérations dégénératives des fibres musculaires (Fig. 7): si certaines d'entre-elles restent sensiblement normales lorsqu'elles sont situées loin des zones d'ossification, d'autres montrent des lésions importantes. La disposition régulière des myofibrilles disparaît, elles deviennent de taille irrégulière et les bandes Z et M n'apparaissent plus situées au même niveau (Fig. 8). La distinction entre les myofilaments épais de la bande A et les myofilaments minces de la bande I s'estompe. Le réticulum sarcoplasmique normalement développé au niveau de ces muscles très actifs est considérablement réduit; les tubules et les vésicules normalement ordonnées sont rares. On retrouve entre les myofibrilles des mitochondries allongées fréquemment soufflées et qui ont perdu leurs crêtes. Les noyaux restent situés sous le sarcolemme qui apparaît parfois épaissi avec une membrane



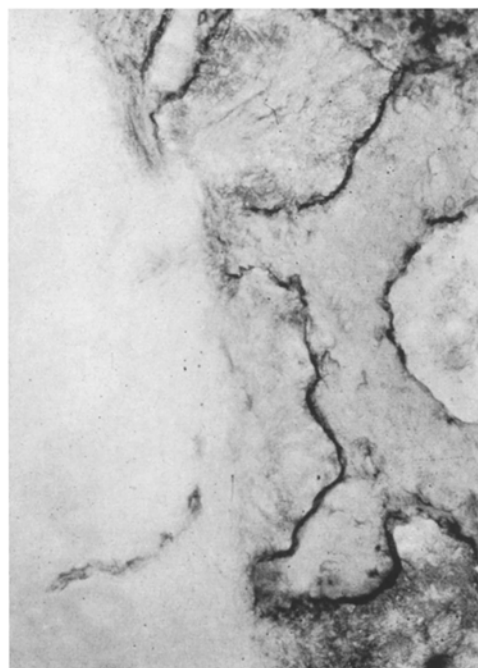
3



4



6



5

Figs. 3—6

Fig. 3. D.P.N.H. diaphorase: positivité intense de nombreux éléments cellulaires actifs, en particulier des ostéoclastes et des chondrocytes. ($\times 110$)

Fig. 4. Phosphatase acide: positivité intense des zones de résorption osseuse et des ostéoclastes ($\times 140$)

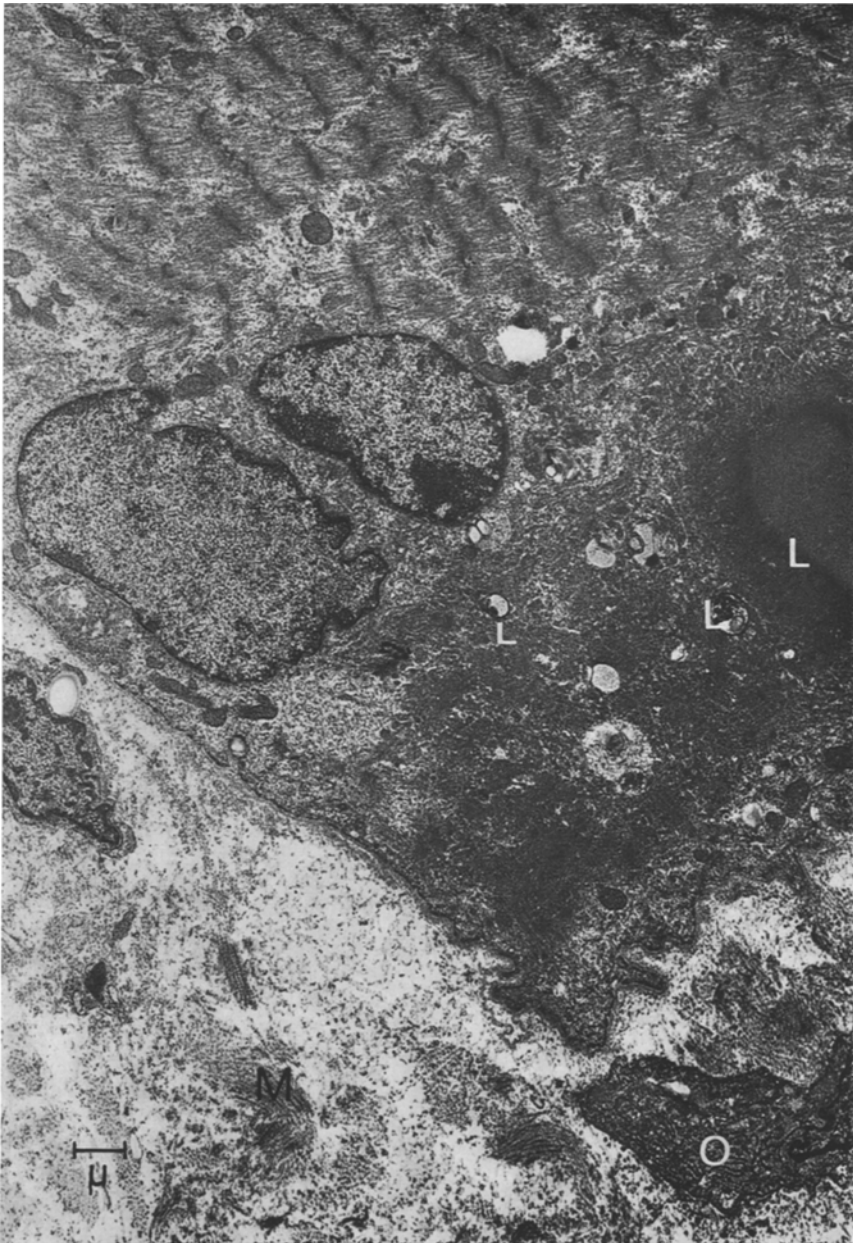


Fig. 7. Myosite ossifiante. Fibre musculaire dont le sarcolemme est épaissi. Au voisinage du noyau nombreux foyers de cytolysé avec démasquage de lipides. *L* lipides; *M* mésenchyme ossifiable; *O* cellules ostéogénitrices, Color. Ur. Plomb

Fig. 5. Phosphatase alcaline (techn. de BURSTONE): positivité de la bordure ostéoïde, du conjonctif fibrillaire actif et des capillaires. Muscle et conjonctif inactif. négatifs ($\times 110$)

Fig. 6. A.T.P.ase: positivité des zones de minéralisation et de quelques cellules cartilagineuses et de vaisseaux ($\times 110$)

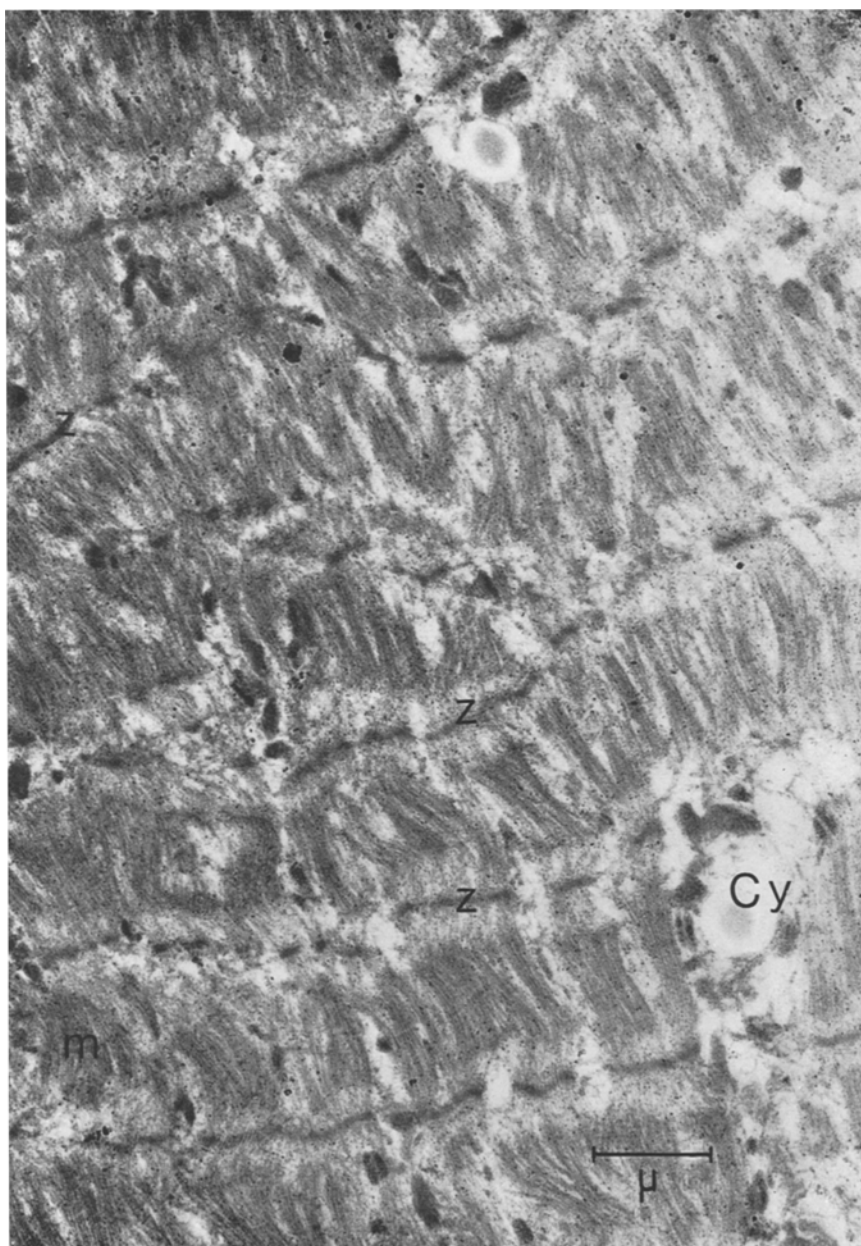


Fig. 8. Myosite ossifiante. Détail du cytoplasme des fibres musculaires. Les bandes Z et M sont irrégulières et les myofilaments désorganisés. *Cy* foyers de cytolysse cytoplasmique. Color. U.P.

nettement supérieure à 500 Angströms. Dans l'atmosphère péri-nucléaire on note l'existence d'enclaves lipidiques assez nombreuses avec un glycogène peu abondant. La détection des enzymes, en particulier des phosphatases acides, extériorise des petits foyers de désintégration intra-cytoplasmique avec une disparition des myofibrilles remplacées par des corps très denses

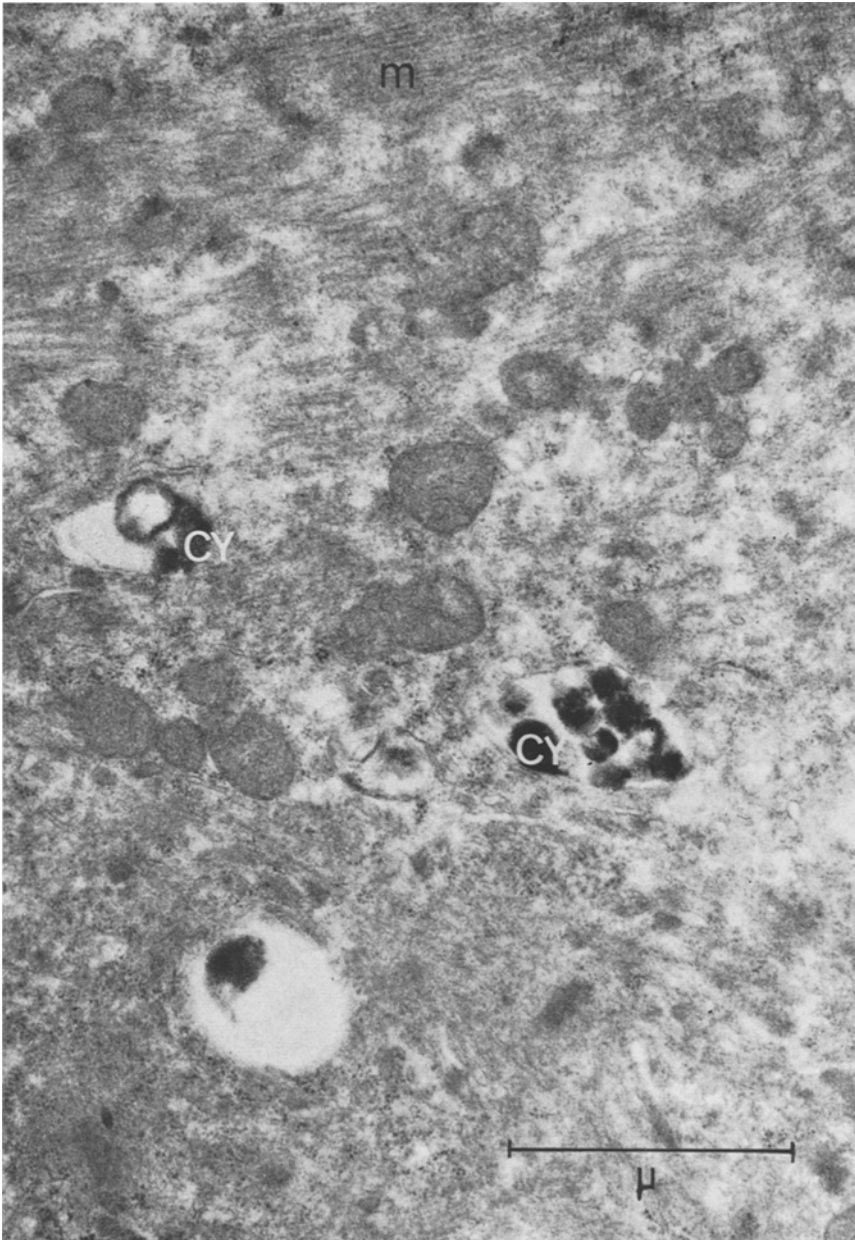


Fig. 9. Myosite ossifiante. Phosphatases acides au niveau du muscle. Les zones de désintégration cytoplasmique montrent de nombreux cytolysomes (*Cy*) riches en phosphatases acides

présentant une activité phosphatasique acide importante et qui semblent correspondre à des cytolysomes (Fig. 9). On retrouve d'ailleurs des images identiques dans les plages proches du noyau.

2. Le mésenchyme interstitiel: c'est à son niveau que l'on observe les images les plus intéressantes (Fig. 10).

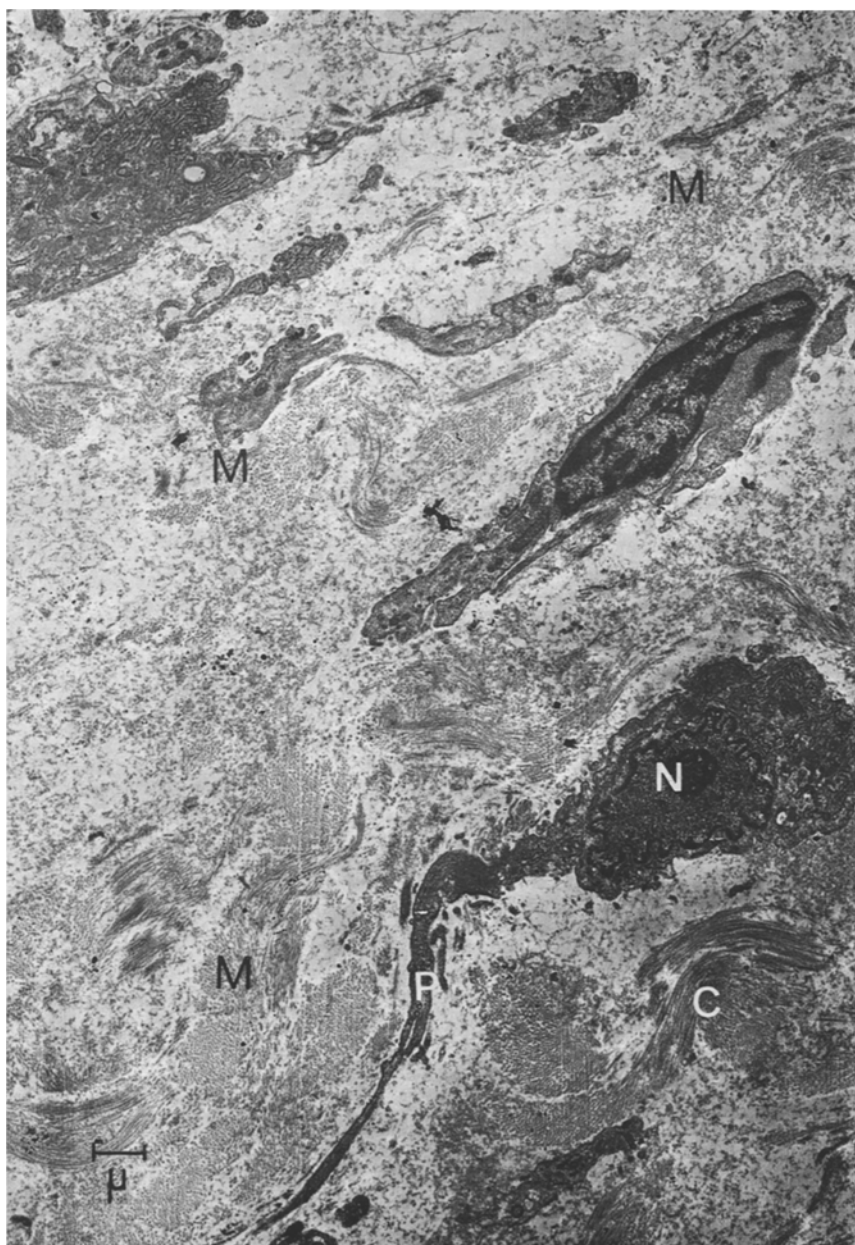


Fig. 10. Mésenchyme ossifiable: les éléments cellulaires émettent de nombreux prolongements (*P*) et prennent l'aspect de cellules ostéogénitrices. *C* collagène. *M* mésenchyme ossifiable. *N* noyau avec nucléole volumineux

Trois faits retiendront notre attention:

— La métamorphose des éléments cellulaires avec l'apparition des cellules ostéogénitrices.

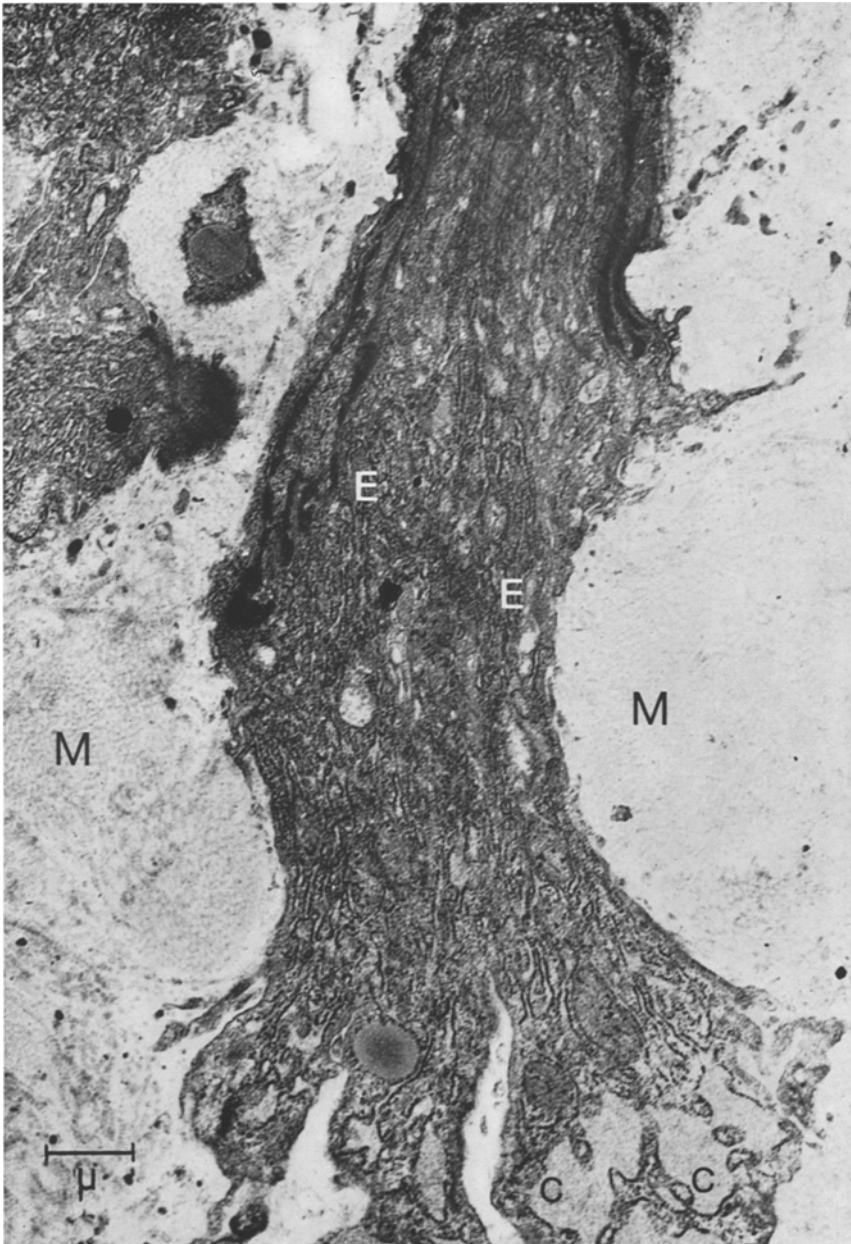


Fig. 11. Détail d'une cellule ostéoformatrice riche en ergastoplasme (*E*) dont l'activité de synthèse apparaît nettement. *M* mésenchyme ossifiable. Color U.P.

- L'aspect particulier des fibres de collagène au voisinage des zones d'ossification.
- Enfin la calcification.
- Les cellules mésenchymateuses au voisinage des zones d'ossification prennent un aspect bien particulier avec l'apparition d'une activité de synthèse extrêmement importante au

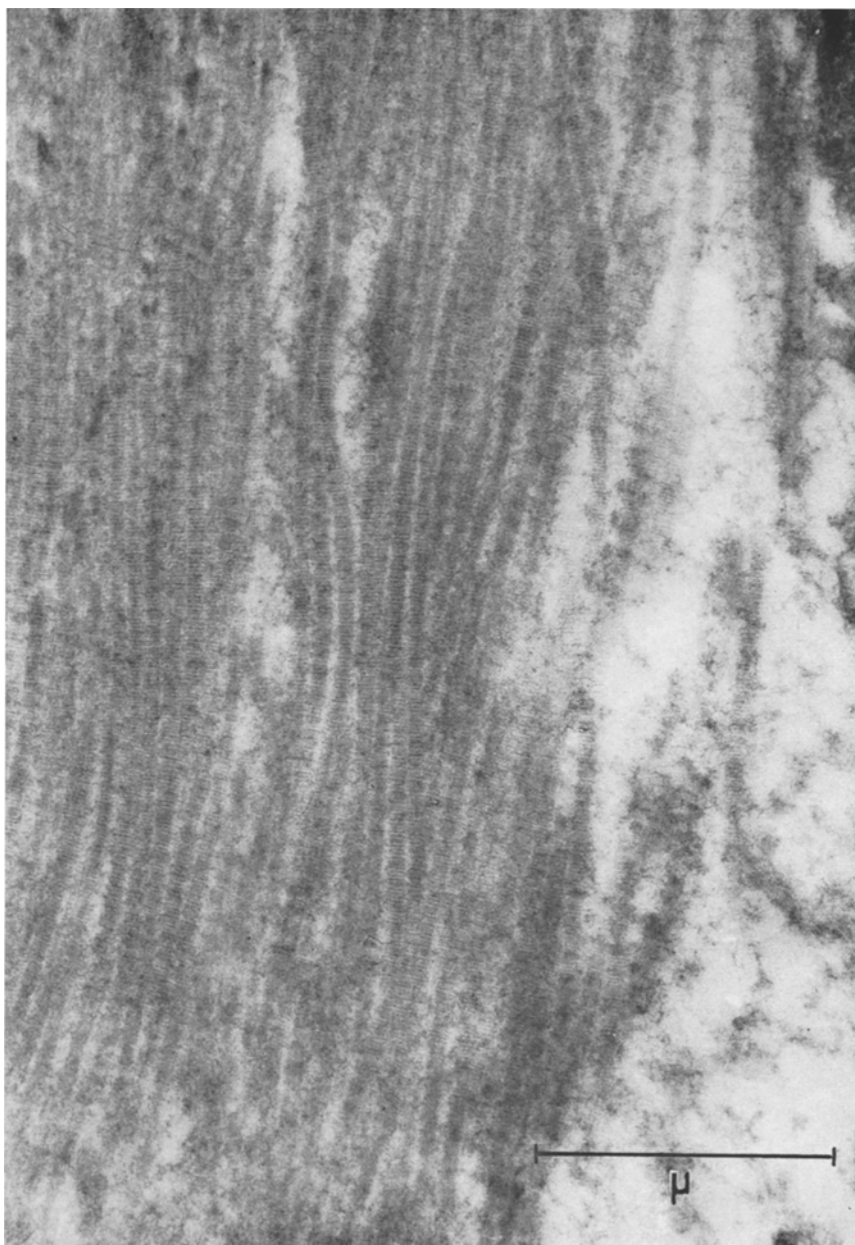


Fig. 12. Aspect du collagène du mésenchyme ossifiable. Ce dernier, anormal, possède une périodicité courte située entre 280 et 350 Å

niveau du cytoplasme différencié et la présence de prolongements cytoplasmiques. Ces cellules, fréquemment de grande taille, possèdent un noyau volumineux à chromatine marginale abondante et un nucléole hypertrophié. L'ergastoplasme est souvent extraordinairement développé avec la constitution de véritables vacuoles contenant un matériel granuleux (Fig. 11).

Les prolongements cytoplasmiques nombreux atteignent parfois plusieurs microns; lorsque les coupes minces passent par le centre de la cellule, celle-ci prend fréquemment un aspect étoilé caractéristique. Ces prolongements sont parfois extrêmement minces et semblent entourés d'un matériel granuleux très dense par rapport à la substance fondamentale de voisinage.

Les fibres de collagène au voisinage des zones d'ossification possèdent une périodicité tout à fait différente de celle des fibres normales. Cette périodicité est variable, mais toujours plus courte que la période normale de 640 Angströms. Les mensurations donnent une moyenne de 280 à 350 Angströms (Fig. 12). De plus, au lieu de retrouver 6 bandes au niveau d'un segment on ne retrouve habituellement que 3 bandes qui apparaissent nettement après colorations spéciales (acide phosphotungstique).

La calcification des zones en voie d'ossification apparaît, d'une manière assez précise après coloration par l'acide phosphotungstique. En effet, on obtient alors des images de «soustraction» (le calcium ayant été dissout par l'acide) qui permettent de retrouver en images négatives des emplacements du calcium. Les cristaux de forme ovale sont disposés le long du matériel fibrillaire y creusant parfois une logette externe. La mensuration de ces cristaux donne 850 Angströms de long sur 500 Angströms. Nous insisterons sur l'intérêt de la technique par l'acide phosphotungstique pour l'étude des calcifications.

Nous insisterons enfin sur les zones de lyse où l'on remarque des images de pousse vasculaire capillaire extrêmement importantes.

Celles-ci prennent l'aspect de vaisseaux extrêmement jeunes, surtout dans les territoires de chondrolyse. Autour des cellules endothéliales turgescentes on remarque dans l'atmosphère péri-capillaire l'existence de cellules de type histiocyttaire riches en lysosomes.

Discussion

L'étude de ce cas de myosite ossifiante circonscrite permet de retrouver 3 différents mécanismes d'ossification: ossification de membrane, enchondrale, ostéoblastique. Il nous paraît intéressant de les caractériser par rapport aux différents modes d'ossification normale et pathologique, aux phénomènes de fibrose sans ossification et aux autres observations comparables de la littérature. Signalons à ce sujet, le très intéressant travail histochimique de BONA et al. (1967) sur 2 cas de Myosite Ossifiante et parmi de nombreux travaux sur les différents aspects de l'ossification, ceux de CABRINI (1961) et de FULLMER (1966). Nous avons pu en outre recueillir diverses données histochimiques et ultrastructurales sur l'os, dans différents états normaux et pathologiques chez le rat et chez l'homme (CAULET et al., 1968).

A. L'étude histochimique

1. Les zones d'ossification membraneuse

Elles apparaissent par fibrose interstitielle. Les fibres collagènes sont riches en groupes aminés libres et seraient pauvres en acides aminés aromatiques et en acides thiolaminés (BONA et al., 1967). La substance fondamentale est riche en glucoprotéines, en M.P.S. acides, partiellement extractibles par la hyaluronidase et en M.P.S. forts sulfatés et phosphatés. Les cellules contiennent peu d'acide ribonucléique et de M.P.S. L'élévation des M.P.S. acides dans les tissus de réparation (conjonctif en voie de cicatrisation) est connue (FULLMER, 1966).

Les cellules fibroblastiques qui deviennent ostéo-progénitrices et ostéocytaires sont de plus en plus riches en acide ribonucléique (BONA et al., 1967). On sait que dans l'ossification membraneuse normale, les précurseurs marqués d'acide ribonucléique sont rapidement incorporés (KOBURG, 1962).

Cette zone est le siège d'une riche synthèse protéique. L'activité aminopeptidasique a été décelée dans les fibroblastes et dans les zones inflammatoires (RAECKELLIO, 1961). La réaction des protéines est positive et l'aspect ressemble à ce que l'on voit dans l'os normal (BALOGH et al., 1961).

Le glycogène est peu abondant. Si les cellules sont pauvres en M.P.S., la substance fondamentale est au contraire très riche en glycoprotéines, en M.P.S. acides faibles, et forts (sulfatés et phosphatés).

La substance inter cellulaire — de même que les ostéoblastes et les cellules ostéoprogénitrices — sont également très riches en phosphatases alcalines. Une telle modification est connue dans la régénération du conjonctif. Les fibroblastes en zone de réparation s'enrichissent en phosphatases alcalines (KAWAKATSU et al., 1960). La précipitation du calcium sur la matrice demande un taux élevé de phosphatases alcalines (WILKINS et al., 1935; ROBINSON et WATSON, 1923). Mais habituellement le tissu de réparation ne se calcifie pas et il ne s'ossifie que très rarement. La transformation osséinique de la substance fondamentale doit être due à l'action d'un facteur qui, rompant un certain équilibre entre les différents constituants, détermine un état identique à celui existant dans les tissus embryonnaires ostéoformateurs. Certains tissus, chez l'homme (muscle — SEIBOLD et DAVIS, 1967, stroma de tumeurs), chez l'animal (myosite ossifiante spontanée et héréditaire, ou expérimentalement (greffes d'épithélium vésical — KAGAWA, 1965) sont plus propices que d'autres, peut-être en fonction d'éléments constituants particuliers (enzymes, substances ou groupes calciphiles), relativement plus abondants, pH favorable, conditions circulatoires (?).

Il est possible que la richesse en groupes alpha-aminés dans la structure du collagène soit un facteur de liaison calcique (nucléation — GLIMCHER, 1960), le minéral se précipitant par cristallisation sous forme d'hydroxyapathite (NEUMANN et NEUMANN, 1958; DALLEMAGNE, 1963) sur certaines structures (par destruction d'un inhibiteur de cristallisation).

BURSTONE (1959) a observé une activité enzymatique phosphatasique acide élevée dans l'os nouvellement formé et la substance fondamentale cartilagineuse. Elle serait plus élevée dans l'os formé que la phosphatase alcaline (transformation d'os immature en os bien minéralisé — MORI et al., 1962).

Les estérases contrairement à ce qu'affirme BURSTONE (1960) ont été trouvées dans les cellules plus que dans la substance fondamentale. Elles existent dans les ostéoblastes et les ostéoclastes.

Les A.T.P.ases sont positives dans les cellules et aussi dans la substance fondamentale dans la zone en voie de minéralisation. L'aspect est identique à celui observé dans l'os normal; elles paraissent liées au processus de minéralisation (CARTIER et PICARD, 1955).

Contrairement à l'observation de BONA et al. (1967), la L.A.P. est élevée ici comme dans l'ossification conjonctive normale (LIPP, 1959), d'ailleurs comme dans les remaniements inflammatoires du conjonctif. La richesse en cytochrome-oxydase est connue (FOLLIS et BERTRONG, 1949) et celle en déshydrogénases; nous l'avons retrouvée dans les ostéoblastes.

Nous n'avons pas étudié la déshydrogénase isocitrique qui serait pour certains (BONA et al., 1967) importante dans la fixation du calcium.

Contrairement à ce que décrit GREENSPAN et BLACKWOOD (1966), les phosphatases alcalines seraient ici liées plus à la protéino-génèse qu'à la calcification.

Les ostéocytes contiennent des enzymes: hydrolases et déshydrogénases qui sont moins abondantes dans les zones centrales moins actives où l'on trouve encore un certain taux de phosphatases alcalines, parfois même de phosphatases acides.

Pour KAGAWA (1965) ces enzymes seraient plutôt détruits au cours de la formation de l'os hétérotopique sur muqueuse vésicale greffée, dans la réaction inflammatoire périphérique.

2. Les zones d'ossification enchondrale

Elles sont analogues à celles observées chez l'homme et les animaux dans les cartilages de croissance et dans certains processus que nous avons pu étudier (exostose); ceci concorde avec les observations de BONA et IONESCU (1965). La zone matricielle apparait par transformation de la substance fondamentale et des cellules incluses (métaplasie cartilagineuse), et richesse en mucosubstances neutres et acides non sulfatées.

La zone de prolifération et une partie de la zone hypertrophique sont relativement très riches en M.P.S. sulfatés. La zone hypertrophique est riche en glycoprotéines et en acide hyaluronique. Cette zone se minéralise parfois (de même que le cartilage du maxillaire en voie d'ossification (GREENSPAN et BLACKWOOD, 1966)), et la substance cartilagineuse devient osseuse. Ce phénomène s'accompagne d'une perte de M.P.S. acides sulfatés et de l'apparition de M.P.S. neutres qui stabiliseraient le collagène (VAN DEN HOOF, 1964). C'est sur ce collagène stabilisé que se cristalliserait le calcium fourni d'ailleurs par la dépolymérisation de l'acide chondroïtine sulfurique ayant fixé préalablement des ions calciques en abondance (BOWNESS, 1962; VAN DEN HOOF, 1964).

Les colorants des protéines et des groupes aminés sont positifs dans ces territoires. Les lignes directrices d'ossification observées dans le cartilage de croissance ne sont pas apparentes ici, et les groupes cellulaires sont un peu irréguliers comme dans le cartilage d'une exostose. L'acide hyaluronique serait cantonné autour des chondroblastes et dans la substance fondamentale du cartilage hypertrophique. La disposition des lignes de basophilie est irrégulière. Il n'y a pas de ligne cimentante anarchique comme dans les processus d'ossification accélérée.

Les M.P.S. acides indiqueraient un métabolisme très actif et les sulfatés une richesse de la substance fondamentale en matériel labile. Les zones cartilagineuses se présenteraient comme un cartilage actif mais dystrophique. La richesse enzymatique est comparable à celle du cartilage normal: déshydrogénases, aminopeptidases, estérases et phosphatases acides en quantité très modérée. Les cellules cartilagineuses dans la zone de prolifération et dans la zone hypertrophique contiennent des phosphatases alcalines de même que dans le cartilage de croissance (TAKADA et OSONAI, 1962). La substance fondamentale contient des phosphatases alcalines mais relativement peu d'A.T.P.ases. Les glycoprotéines sont moins abondantes que dans l'os.

3. Les zones de lyse

Elles sont riches en enzymes hydrolytiques, en particulier en phosphatases acides. Ceci concorde avec les études sur l'ostéolyse d'origine vasculaire (CAULET

et al., 1968), sur la phagocytose (BARKA, 1962). Leur support serait les lysosomes. Les estérases sont également élevées. Le cytoplasme de l'ostéoclaste a suscité de nombreuses études qui ont souligné leur activité (MITROVIC et al., 1964). Cet aspect de lyse est toujours retrouvé sur un point ou sur un autre des blocs cartilagineux, elle précède l'ossification. L'activité déshydrogénasique est connue dans les cellules géantes de résorption (BAKER et KLAPPER, 1961).

Nous avons observé leur taux très élevé, ce qui concorde avec les observations de BALOGH et al., 1961; FULLMER, 1966), qui les ont étudiées dans différents processus. Ces auteurs y ont aussi trouvé des déshydrogénases isocitriques élevées contrairement à WALKER (1961), qui avait pensé en faire le témoin enzymatique de la décalcification.

Les phosphatases acides sont par ailleurs plus abondantes dans les chondrocytes lorsqu'ils deviennent hypertrophiques au moment de la calcification et avant la lyse, de même dans les chondrocytes au niveau des zones de chondrolyse vasculaire. Le glycogène y paraît abondant.

4. Les zones de remaniements et l'ossification ostéoblastique

Elles ont un profil histochimique et enzymatique normal, paraissant suivre la vie d'un tissu osseux normal (BURSTONE, 1960; CABRINI, 1961). Les bordures ostéoblastiques sont riches en substances basophiles, en acide ribonucléique et possèdent de nombreux enzymes: phosphatases alcalines surtout, quelques phosphatases acides, 5 nucléotidases et estérases, et D.P.N.H. La S.D.H. et la cytochrome-oxydase y sont retrouvées, en quantité modérée. Pour BONA et al. (1967) la richesse en phosphatases alcalines irait de pair avec la pauvreté relative en glycogène et en M.P.S. acides.

B. L'étude ultrastructurale

nous apporte de précieux renseignements pour la compréhension du mécanisme lésionnel. Nous n'insisterons pas sur les aspects dégénératifs des fibres musculaires, mais retiendrons surtout l'ossification du mésenchyme ossifiable. L'étude ultrastructurale de l'ossification normale en milieu conjonctif a fait l'objet de plusieurs travaux (FRANK, 1963; ASCENZI et al., 1965).

Certains auteurs (McKUSICK, 1966) rangent la myosite ossifiante dans le cadre des affections du tissu conjonctif d'origine génétique. Nos observations sur le collagène anormal à période courte au niveau du mésenchyme ossifiable apportent semble-t-il un argument important en faveur de cette hypothèse (Fig. 12). L'aspect très particulier de ce collagène est vraisemblablement en rapport avec l'ossification et la calcification pathologiques.

Dans d'autres ossifications anormales on a pu mettre en évidence des altérations des fibres de collagène; ainsi VAN DEN HOOF et al. (1959), MATUKAS et al. (1967), ont montré dans le lathyrisme des anomalies du diamètre des fibres de collagène. L'existence d'autres anomalies osseuses au cours de certaines myosites (STEPHAN et GOETZEL, 1967) n'est pas sans intérêt pour soutenir la nature génétique du trouble.

Il faut également insister sur le fait que certains mésenchymes pathologiques actifs ne présentent pas d'ossification: nous avons observé sur le plan histochimique

et ultrastructural une fibrose rétropéritonéale idiopathique (MATHIS et al., 1968). Cette sclérose dystrophique en remaniement montre également une activité de synthèse protéique considérable et des fibres de collagène à période plus longue que normalement (de 850 à 1000 Angströms). Ce dernier caractère n'est peut-être pas sans rapport avec l'absence d'ossification au niveau de ces lésions.

Notre étude sur le tissu calcifié permet difficilement d'apprécier l'état des fibres de collagène. En particulier le dépôt calcique est difficile à localiser par rapport à la périodicité des fibres. Ces études de calcification par rapport aux bandes ont été précisées par ROBINSON et WATSON (1955), GLIMCHER (1960), JACKSON (1967). Il nous semble que la cristallisation prend ici la fibre de collagène comme un véritable moule: en effet les logettes réalisant des images de «soustraction» par dissolution dues à l'acide phosphotungstique semblent posséder d'étroits rapports avec les fibres de voisinage.

Enfin, les images de lyse d'origine vasculaire des plages cartilagineuses ne présentent jamais les mêmes aspects que celles rencontrées au cours de certaines ostéolyses pathologiques où les vaisseaux semblent jouer un rôle prépondérant (CAULET et al., 1968).

Conclusion

Les observations histochimiques et enzymologiques montrent donc que des conditions apparemment voisines de celles de l'os normal sont réalisées dans la matrice conjonctive d'ossification, apparaissant dans le muscle au cours de la myosite ossifiante circonscrite. Néanmoins, la modification des facteurs étudiés est semblable à celle relevée dans les tissus conjonctifs en réparation, qui pourtant ne s'ossifient pas. Ainsi, comme pour l'ossification normale, le déterminisme profond du phénomène est ici inconnu. La transformation des conditions circulatoires locales, en particulier dans la circulation non figurée, interstitielle, qui dépend en grande partie de l'état de la substance fondamentale, des M.P.S., de la réticuline, pourrait être un des intermédiaires importants dans l'apparition du processus. La recherche de modifications dans le métabolisme des protéines, des M.P.S. acides et dans l'arsenal enzymatique, paraît importante à poursuivre. Cette enquête serait particulièrement intéressante dans les observations familiales où un facteur génétique est remarqué, en particulier dans la myosite ossifiante progressive où l'association d'autres altérations osseuses est signalée (STEPHAN, 1967). En faveur de cette hypothèse nous retiendrons l'existence ici d'un collagène anormal, à période courte (280 à 350 Angströms) qui joue vraisemblablement un rôle important dans la genèse de l'ossification pathologique.

Nous remercions pour leur collaboration technique Mesdemoiselles E. CHARPENTIER, F. FUSELIER, A. PETIT.

Bibliographie

- ASCENZI, A., E. BONUCCI, and D. S. BOCCIARELLI: An electron microscope study on primary periosteal bone. *J. Ultrastruct. Res.* 18, 605—618 (1965).
 BAKER, B. L., and Z. C. KLAPPER: Oxidative enzymes in the foreign body giant cell. *J. Histochem. Cytochem.* 9, 713—714 (1961).
 BALOGH, K., H. R. DUDLEY, and R. B. COHEN: Oxydative enzyme activity in skeletal cartilage and Bone. *Lab. Invest.* 10, 839—845 (1961).

- BARKA, T.: Cellular localization of acid phosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 231 (1962).
- , and P. J. ANDERSON: *Histochemistry theory, practice and bibliography*, vol. 1. New York: Hoeber 1963.
- BONA, C., and V. IONESCU: Histochemical studies on tibial growing cartilage, in polyepiphyseal dysplasia. *Acta histochem. (Jena)* **21**, 284—298 (1965).
- V. STANESCU, M. S. DIMITRESCU, and V. IONESCU: Histochemical and cytoenzymological studies in myositis ossificans. *Acta histochem. (Jena)* **27**, 207—224 (1967).
- BOWNESS, J. M.: Calcium binding by chondroitin sulfate associated with collagen. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **58**, 134—136 (1962).
- BURSTONE, M. S.: Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 39—45 (1959).
- Histochemical observations on enzymatic process in bone and teeth. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **85**, 433—444 (1960).
- CABRINI, R. L.: Histochemistry of ossification. *Int. Rev. Cytol.* **11**, 283—306 (1961).
- CARTIER, P., et S. PICARD: La minéralisation du cartilage ossifiable. IV. La signification de la réaction A. T. Pasique. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* **37**, 1169—1176 (1955).
- CAULET, T., J. J. ADNET, CL. HOPFNER et F. DROUARD: Sur quelques aspects particuliers de l'ostéogénèse et de l'ostéolyse normales et pathologiques. Étude histochemique et ultra-structurale. *Ann. Univers. (Assoc. Rem. Étud. Rech. Scien)* **6**, 29—36 (1968).
- M. FANDRE, J. J. ADNET, R. COFFIN, F. PENNAFORTE et J. MATHEY: Ostéolyse étendue scapulo-costale unilatérale. A propos d'une observation. *Annales Anat. Path.* **13**, 177—200 (1968).
- DALLEMAGNE, M. J.: Aspect biochimique de l'ossification. *Rev. lyon. Méd.* **12**, 917—925 (1963).
- FOLLIS, R. H., and M. BERTHRONG: Histochemical studies on cartilage and bone. *Bull. J. Hopk. Hosp.* **85**, 281—296 (1949).
- FRANK, R. M.: Étude au microscope électronique de l'ossification en milieu conjonctif. *Ann. Histochem.* **8**, 25—34 (1963).
- FULLER, H. M.: The histochemistry of the connective Tissue. *Int. Rev. connect. Tissue Res.* **3**, 1—89 (1966).
- GABE, M.: *Techniques histologiques*. Paris: Masson & Cie. 1968.
- GLIMCHER, M. J.: Specificity of the molecular structure of organic matrices. In: *Mineralization; in: Calcification in biological systems*, ed. by R. F. SOGNAES. Amer. Ass. for Adv. of Sci., Wash., p. 421—487 (1960).
- GREENSPAN, J. S., and H. J. J. BLACKWOOD: Histochemical studies of chondrocyte function in the mandibular condyle of the rat. *J. Anat. (Lond.)* **100**, 615—626 (1966).
- HOOF, A. VAN DEN: Polysaccharide histochemistry of enchondral ossification. *Acta. anat.* **57**, 16—28 (1964).
- C. I. LEVENE, and J. GROSS: Morphologic evidence for collagen changes in chick embryos treated with B-Aminopropionitrile. *J. exp. Med.* **110**, 1017 (1959).
- JACKSON, S. F.: The fine structure of developing bone in the embryonic fowl. *Proc. Soc. London. B* **146**, 270—280 (1957).
- KAGAWA, S.: Enzyme histochemistry of bone induction by urinary bladder epithelium. *J. Histochem. Cytochem.* **13**, 255—264 (1965).
- KAWAKATSU, K., M. MORI et A. KISHIRO: (cité par FULLMER, H. M.) *Dental Bull. Osaka Univ.* **1**, 79 (1960).
- KOBURG, E.: Autoradiographic investigation of protein and nucleic acid metabolism of the cells of cartilage and bone. *Ann. Histochem.* **7**, 97—102 (1962).
- LIPP, W.: Amino-peptidase in bone cells. *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 205 (1959).
- MATHIS, L., T. CAULET, J. J. ADNET et CL. HOPFNER: Fibrose rétropéritonéale idiopathique. Étude histochemique et ultrastructurale d'une observation. *Ann. Chir.* **22** (C.), 1047—1055 (1968).
- MATUKAS, V. J., B. J. PANNER, and J. L. ORBISON: Ultrastructure evidence for an abnormality in protein saccharide metabolism in lathyrus cartilage. *Lab. Invest.* **16**, 726—735 (1967).
- McKUSICK, W. A.: *Heritable disorders of connective tissue*. St.-Louis: Mosby 1966.

- MITROVIC, D., A. MAZABRAUD et S. DE SEZE: Remarques cytochimiques sur l'ostéoclaste. *Ann. Anat. path.* **9**, 295—308 (1964).
- MORI, M., K. TAKADA, and K. OKAMOTO: Histochemical studies on the localization and activity of acid phosphatase in calcifying tissues. *Histochemie* **2**, 427—434 (1962).
- NEUMAN, W. F., and M. W. NEUMAN: *The chemical dynamics of bone mineral*, p. 179. Chicago: University of Chicago Press 1958.
- RAECKELLIO, J.: Histochemical studies on vital and post-mortem skin wounds. *Ann. Med. exp. Fenn.* **39** (Suppl. 6), 1—105 (1961).
- ROBINSON, R.: Possible significance of hexosophosphoric ester in calcification. *Biochem. J.* **17**, 286—293 (1923).
- , and M. L. WATSON: Crystal-collagen relationships in bone in the electron microscope. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **60**, 596—628 (1955).
- SEIBOLD, H. R., and C. L. DAVIS: Generalized myositis ossificans (familial) in pigs. *Path. Vet.* **4**, 79—88 (1967).
- STEPHAN, H., L. GOTZEL: Zum Krankheitsbild der Myositis ossificans progressiva. *Münch. med. Wschr.* **109**, 1117—1124 (1967).
- TAKADA, K., and K. OSONAI: Histochemical detection of succinic deshydrogénase activity in the developing bone and cartilage. *Arch. histol. jap.* **22**, 265—271 (1962).
- WALKER, D. G.: Citric acid cycle in osteoblasts and osteoclasts. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **106**, 80 (1961).
- WILKINS, W. E., E. M. REGEN, and G. K. CARPENTER: Phosphatase studies on biopsy tissue in progressiva myositis ossificans. *Amer. J. Dis. Child.* **49**, 1219—1221 (1935).

Prof. T. CAULET
Laboratoire d'Anatomie Pathologique
Faculté de Médecine
Reims, France