



Caractéristiques physico-chimiques, genèse et conséquences tissulaires des dépôts cutanés calciques

Hester Colboc

► To cite this version:

Hester Colboc. Caractéristiques physico-chimiques, genèse et conséquences tissulaires des dépôts cutanés calciques. Dermatologie. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT: 2022SORUS081 . tel-03872522

HAL Id: tel-03872522

<https://theses.hal.science/tel-03872522>

Submitted on 25 Nov 2022

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.

Sorbonne Université

ED 394 - Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

INSERM U1155 - Des Maladies Rénales Rares aux Maladies Fréquentes,

Remodelage et Réparation

Caractéristiques physico-chimiques, genèse et conséquences tissulaires des dépôts cutanés calciques

Par Hester COLBOC

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par le Pr Emmanuel LETAVERNIER et le Pr Vincent DESCAMPS

Présentée et soutenue publiquement le 31 mai 2022

Devant un jury composé de :

Pr Bernaudin, Jean-François, Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Président du jury

Pr Prié, Dominique, Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Rapporteur

Pr Leftheriotis, Georges, Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Rapporteur

Dr Milon, Geneviève, Directrice de Recherche, Examinatrice

Dr Policar, Clotilde, Directrice de Recherche, Examinatrice

Dr Bazin, Dominique, Directeur de Recherche, Examinateur

Pr Descamps, Vincent, Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Directeur de thèse

Pr Letavernier, Emmanuel, Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Directeur de thèse

Remerciements

Au Pr Jean-François Bernaudin, pour avoir accepté de présider ce jury, pour sa bienveillance constante et pour m'avoir donné l'envie de concrétiser ce projet de recherche par une thèse de sciences.

Au Pr Emmanuel Letavernier, pour avoir accepté de co-encadrer cette thèse mais aussi pour m'avoir accueillie dans son unité, même si mes thématiques de recherche sont parfois éloignées des siennes. Nos échanges sont toujours d'une aide précieuse sur ma réflexion scientifique.

Au Pr Vincent Descamps, qui a accepté de co-encadrer cette thèse, après avoir déjà encadré ma thèse de médecine. Vous m'avez transmis votre intérêt pour l'exposome et perçu l'intérêt des outils de caractérisation physico-chimique dans ce domaine tout en me permettant de travailler sur cette thématique porteuse.

Au Dr Dominique Bazin, pour m'avoir fait découvrir les outils physico-chimiques et leur application en dermatologie. Ton dynamisme et ta positivité ont été d'un grand soutien au cours de ces années de thèse.

Au Pr Georges Lefthériotis et au Pr Dominique Prié, qui me font l'honneur de juger ce travail.

Au Dr Geneviève Milon et au Dr Clotilde Policar, qui me font l'honneur de faire partie de ce jury.

Au Dr Philippe Moguelet, grâce à qui tout a commencé : la dermato-pathologie, l'étude des granulomes sarcoïdiques... et grâce à qui tout continue également, merci.

Au Dr Patricia Senet, pour ta gentillesse, ta constante disponibilité et ta capacité à entrevoir les applications cliniques des techniques utilisées.

Au Dr Marie-Claire Schanne-Klein, merci de m'avoir accueillie au LOB avec tant de bienveillance et de m'avoir fait découvrir, outre la microscopie multiphoton, une démarche scientifique d'analyse d'image rigoureuse.

Aux membres de l'équipe INSERM URMS 1155, toujours disponibles et accueillants. A Chantal, Souhila et Marie-Christine, sans qui de nombreux échantillons n'auraient pu être préparés voir analysés lorsqu'il a fallu passer des nuits au Synchrotron. Merci à Ellie, Elise et Jérémy pour votre aide indispensable dans la réalisation de Yasue et d'immuno-histochimie.

Aux membres de l'équipe des explorations fonctionnelles multidisciplinaires de l'hôpital Tenon, au Dr Daudon et au Dr Frochot sans qui les analyses infrarouges n'auraient pu être faites.

Aux équipes du synchrotron SOLEIL, Solenn Reguer, Kadda Medjoubi, Andréa Somogyi, Matthieu Réfrégiers, ainsi qu'aux autres physiciens et chimistes avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler : Ivan Lucas, Arnaud Dubois, Raphaël Weil, Antoine Boury et Stephan Rouzière. Grâce à nos collaborations, j'ai découvert de nouvelles manières d'explorer les structures et les pathologies cutanées.

Au Dr Sylvie Meaume, ainsi qu'à toute l'équipe médicale, paramédicale et aux secrétaires de l'hôpital Rothschild. Votre confiance dans le fait que « ça va marcher » me porte au quotidien. Un merci tout particulier aux chercheuses de « lithiases de jambe », à Océane, Béatrice, Martine et Julie, sans qui la publication sur les ulcères de jambes calcifiés n'aurait pu voir le jour.

A mes amis qui me permettent de prendre des bouffées d'air frais régulièrement, et de rompre avec un quotidien exigeant le temps d'une soirée ou d'un week-end.

A mes parents, mon frère Adrien, ma sœur Judith et ma grand-mère. Votre soutien inébranlable m'a permis de me ressourcer tant de fois, et de toujours trouver l'énergie pour atteindre mes objectifs.

A mon frère Kevin. Nos discussions scientifiques autour d'un exercice de math de Terminal m'ont sans nul doute aidé à en arriver là où j'en suis... et de ce point de vu là, ça n'était pas gagné ! Tu me manques, pour tant de choses et si souvent, comme pour ce travail de thèse, dont j'aurais adoré discuter avec toi.

Et bien sûr, à ma « petite » famille. A Paul, pour être exceptionnel. A Gustave, Mathilde et Basile, vous êtes mes rayons de soleil.

SOMMAIRE

I. Introduction.....	6
1) Généralités concernant les dermatoses calcifiantes	7
2) Physiogenèse des calcifications cutanées.....	11
<i>a) Eléments augmentant la sursaturation</i>	<i>11</i>
<i>b) Elément diminuant la sursaturation</i>	<i>14</i>
<i>c) Eléments favorisant la nucléation</i>	<i>17</i>
3) Localisation tissulaire des calcifications cutanées.....	18
4) Lien entre inflammation et calcifications cutanées	20
5) Traitements des calcifications cutanées	23
<i>a) Bisphosphonates.....</i>	<i>23</i>
<i>b) Thiosulfate de sodium.....</i>	<i>23</i>
<i>c) Tétracycline</i>	<i>24</i>
<i>d) Traitements physiques</i>	<i>24</i>
6) Diversité structurale des calcifications cutanées	24
7) Diversité chimique des calcifications cutanées	27
<i>a) Eléments de chimie relatifs à la partie inorganique des calcifications cutanées...</i>	<i>27</i>
<i>b) Exemples d'outils utilisés dans la caractérisation chimique des calcifications pathologiques.....</i>	<i>28</i>
<i>c) Exemples d'application de ces outils en dermatologie.....</i>	<i>31</i>
 II. Résultats.....	 33
1) Localisation, morphologie et composition chimique des calcifications cutanées au cours de la calciphylaxie (article publié dans le JAMA Dermatology)	34
2) Ulcères de jambe calcifiés du sujet âgé: description clinique et caractérisation structurale et chimique (article publié dans le Journal of Gerontology)	42
3) Calcinosis cutis au cours de la nécrolyse épidermique : rôle de la caspofungine ? (article publié dans le Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology)	49
4) Caractérisation physico-chimique des dépôts inorganiques associés aux granulomes sarcoïdosiens cutanés (article publié dans le Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology)	53
5) Pathologies associées aux dépôts anormaux en dermatologie : une approche physico-chimique (article publié dans les Comptes Rendus - Chimie).....	61
 III. Discussion et perspectives	 95
1) Apport des techniques utilisées dans la compréhension de la physiogenèse des calcifications cutanées.....	95
<i>a) Aspect structural.....</i>	<i>95</i>
<i>b) Aspect chimique.....</i>	<i>100</i>
2) Apport des techniques utilisées dans l'élaboration de pistes thérapeutiques.....	101
<i>a) Considération sur les thérapeutiques existantes.....</i>	<i>101</i>
<i>b) Pistes thérapeutiques envisagées.....</i>	<i>102</i>
3) Limites.....	103

4) Perspectives.....	104
<i>a) Microscopie Multiphoton.....</i>	<i>104</i>
<i>b) Techniques de caractérisation physico-chimique in vivo.....</i>	<i>108</i>
IV. Conclusion	110
Annexe.....	111
Références	116

I. INTRODUCTION

De nombreuses pathologies sont associées à la présence de dépôts anormaux, minéraux ou organiques, d'origine endogène ou exogène, expliquant le grand intérêt que la communauté scientifique et médicale leur porte. Leur complexité structurale et chimique rend difficile la description des processus biochimiques inhérents à leur pathogenèse, des altérations tissulaires associées et du lien exact avec la pathologie sous-jacente : simple élément « satellite » de la pathologie ? Lien de causalité ? ¹⁻³

La dermatologie n'échappe pas à cette problématique. Diverses dermatoses sont associées à des dépôts minéraux soit endogènes soit exogènes ^{4,5}. Les dépôts minéraux endogènes cutanés sont généralement composés de phosphate de calcium de structure apatitique et sont souvent considérés comme la conséquence de la dermatose à laquelle ils sont associés ⁵. Ils sont habituellement désignés dans la littérature sous le terme de « calcinosis cutis » et se distinguent des phénomènes d'ossification cutanée, ou « ostéosis cutis », plus rares, volontiers satellite de néoplasie cutanée ^{6,7}.

Les dépôts cutanés exogènes peuvent quant à eux se présenter sous diverses phases chimiques, et sont souvent considérés comme des causes potentielles de la pathologie ⁸. Ils s'intègrent depuis 2005 dans le concept d'exposome, regroupant l'ensemble des facteurs environnementaux associés à la survenue de pathologies ⁹. L'exposome regroupe l'exposition à diverses particules, présentes dans les aliments, l'air ou les topiques appliqués sur le revêtement cutané. Il concerne par conséquent les organes en lien avec l'environnement, et donc principalement les épithéliums cutanés, respiratoires et digestifs. Ces particules peuvent pénétrer dans la peau de différentes façons : au cours d'un traumatisme, entraînant une brèche de l'épiderme, au cours d'une injection ou via les orifices folliculaires ¹⁰. En dermatologie, les développements récents dans le domaine des nanotechnologies ont permis d'établir un lien entre l'exposome et certaines dermatoses, comme la sarcoïdose ^{11,12}, l'alopecie fibrosante frontale ^{13,14} et les réactions d'hypersensibilité sur encres de tatouage ^{15,16}.

L'une des approches permettant de mieux comprendre les phénomènes physiopathologiques associés à ces dépôts consiste à caractériser leur composition chimique, leur structure et à préciser leur localisation tissulaire voir subcellulaire. En raison de leur taille sub-micrométrique ainsi que de leur diversité de composition, ces caractérisations ne peuvent être que partiellement réalisées avec les techniques hospitalières conventionnelles. Certaines colorations classiques telles que le Von Kossa, le Yasue ou le rouge alizarin peuvent par exemple montrer la nature

phosphocalcique de dépôts, mais elles n'apportent pas plus d'informations sur leur composition chimique¹⁷. Ainsi il n'est pas possible de distinguer les différents types de phosphate de calcium parmi lesquels le phosphate octocalcique, le phosphate de calcium amorphe ou encore le phosphate de calcium de structure apatitique pourtant associé à des contextes pathologiques très différents¹⁸.

Des techniques physico-chimiques ont donc été développées et appliquées avec succès à diverses calcifications pathologiques dans différents organes, tels que le rein^{19,20}, la prostate²¹ ou la thyroïde²². Ces techniques sont complémentaires et multiples : microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX)^{23,24} pour imagerie et détermination de la composition élémentaire des dépôts à des échelles nanométriques, spectrométrie par fluorescence X (XRF)^{25,26} permettant une description élémentaires des dépôts, spectroscopies vibrationnelles que sont la spectroscopie par transformée de Fourier (FT-IR) et la spectroscopie Raman²⁷⁻³¹ pour identifier précisément les composés chimiques présents, ainsi que des techniques spécifiques au rayonnement synchrotron^{32,33} telles que la spectroscopie de structure près du seuil d'absorption de rayons X (XANES)^{34,35}. L'application de ces techniques à certaines pathologies a permis au clinicien une meilleure compréhension de la physio genèse de ces dépôts³⁶, de poser un diagnostic de manière plus précoce³⁷ ou de développer des pistes thérapeutiques³⁸. Bien que certaines de ces techniques aient déjà été appliquées en dermatologie, il reste de nombreuses pathologies à explorer et de nombreux outils à appliquer à celles-ci.

L'objectif de ma thèse est d'appliquer ces techniques à la caractérisation physico-chimique des calcifications au cours de diverses dermatoses afin de mieux en comprendre la physio genèse et les conséquences tissulaires de ces dépôts calciques en montrant l'intérêt de ces techniques pour le clinicien.

1) Généralités concernant les dermatoses calcifiantes

Les calcifications cutanées sont observées au cours de dermatoses d'étiologies variées : inflammatoires, génétiques, tumorales, infectieuses...³⁹. Une classification de ces calcifications en fonction du processus physiopathologique associé à leur physio genèse est rapportée dans la littérature, permettant de distinguer les calcifications métastatiques, dystrophiques, idiopathiques et iatrogènes⁶ (tableau I). Les deux types de calcifications les

plus fréquemment rencontrées sont les métastatiques et dystrophiques ³⁹ (Figures 1 et 2).

Type de calcifications	Mécanisme suspecté de genèse des calcifications	Exemples de dermatoses calcifiantes
Métastatique	Trouble systémique du métabolisme phosphocalcique	Calciphylaxie urémique Calcinose tumorale hyperphosphatémique familiale ⁴⁰ Sarcoïdose Syndrome paranéoplasique
Dystrophique	Altération tissulaire conduisant à la formation de dépôts phosphocalciques	Connectivite Sclérodermie systémique ⁴¹ Lupus ⁴² Dermatomyosite ⁴³ Néoplasie cutanée Infection Post traumatisme Insuffisance veineuse chronique
Iatrogénique	Forte concentration phosphocalcique tissulaire localisée, conséquence d'un traitement médicamenteux	Diffusion de perfusion intraveineuse de gluconate de calcium Injection d'héparine calcique
Idiopathique	Pas de trouble du métabolisme phosphocalcique ni d'altération tissulaire	Calcinose scrotale

Tableau I. Types de calcifications cutanées, physio genèse suspectée et pathologies associées.



Figure 1 : Exemples cliniques de calcifications cutanées dystrophiques, dans le cadre d'une dermatose inflammatoire (A) et post traumatique (B). A. Patiente présentant une sclérodermie systémique et des lésions des membres inférieurs à type de morphées. La biopsie cutanée de ces lésions a retrouvé des calcifications dermiques multiples. B. Patiente aux antécédents de brûlures profondes du membre inférieur. Survenue plusieurs dizaines d'années après le traumatisme de plaies sur les cicatrices, associées à l'expulsion de calcifications. (*Cas du service Plaies et Cicatrisation, hôpital Rothschild*).



Figure 2 : Autres exemples cliniques de calcifications cutanées dystrophiques, dans le cadre de dermatoses inflammatoires A. Calcifications cutanées digitales dans le cadre d'une sclérodermie systémique avec (étoile) et sans (flèche) ulcération. B. Calcifications sous cutanée du vertex dans le cadre d'un CREST (calcifications sous cutanées, syndrome de Raynaud, trouble de la mobilité œsophagienne, sclérodactylie et tégangiectasies) syndrome (forme de sclérodermie). D'après Reiter et al. *J Am Acad Dermatol*. 2011.

Le type de calcifications associées à certaines des dermatoses calcifiantes est parfois difficile à catégoriser de façon formelle. Les patients atteints de pseudoxanthome élastique, par exemple, présentent à la fois un déficit en pyrophosphate, un inhibiteur de calcifications, et des altérations des fibres élastiques dermiques rendant difficile la classification de ces calcifications en métastatiques ou dystrophiques de façon claire ⁴⁴.

En outre, il existe volontiers une association de mécanismes conduisant à la survenue de calcifications ectopiques. Ainsi, dans la dermatomyosite et la sclérodermie, on constate que les calcifications touchent le plus souvent les zones sujettes aux traumatismes récurrents, avec par exemple dans la sclérodermie une atteinte plus fréquente de la main dominante, et parmi les doigts, du pouce ⁴⁵. Ceci suggère l'association de phénomènes inflammatoires - liés à la pathologie dermatologique - et post traumatique, conduisant à des remaniements tissulaires propice aux calcifications. De même, les altérations tissulaires associées, en soit, à toute forme

d'injection dans le tissu cutané, pourraient contribuer à la genèse des calcifications iatrogènes au cours de l'administration de produits à forte concentration phosphocalcique ³⁹.

2) Physio genèse des calcifications cutanées

Sur le plan moléculaire, la genèse des calcifications cutanées est complexe, mettant en jeu diverses protéines inhibitrices ou promotrices de minéralisation, des cellules et l'environnement tissulaire, mais également divers processus biochimiques associées aux processus de nucléation (homogène ou hétérogène) et de sursaturation ³⁶.

La sursaturation est associée aux concentrations locales des constituants au sein du tissu (ici de Calcium et Phosphate), et conditionne à la fois la cinétique de cristallisation et le nombre de cristaux créés, et par voie de conséquence leurs évolutions et propriétés ultérieures, au premier rang desquelles la taille. La nucléation correspond à la formation des « germes » de cristaux dans un milieu sursaturé qui favorise la formation d'agrégats moléculaires, pouvant ainsi être comparé à des briques élémentaires des futurs cristaux ³⁶.

On qualifie de primaire la nucléation qui prend place initialement dans un milieu fortement sursaturé et de secondaire celle qui survient dans un milieu contenant déjà des cristaux. On distingue également les processus de nucléation homogène pour lequel on a la même probabilité de formation d'un nucleus critique dans tout le volume de la solution sursaturée et de nucléation hétérogène, où le nucleus se forme sur des sites de nucléation préférentiels pouvant correspondre à des éléments tissulaires (ADN, fibres de la matrice extracellulaire...) ou des germes de cristaux ³⁶.

a) Eléments augmentant la sursaturation

- **Phosphate**

Le rein étant le principal régulateur de l'homéostasie du phosphate dans l'organisme, sa dysfonction est donc l'une des principales causes d'hyperphosphatémie ⁴⁶. L'hyperphosphatémie associée à l'insuffisance rénale est pourvoyeuse de diverses pathologies, dont la calciphylaxie urémique ⁴⁷.

Outre la calciphylaxie urémique, l'hyperphosphatémie est également associée à la survenue de calcifications cutanées au cours de la calcinose tumorale hyperphosphatémique familiale. Les phénomènes génétiques et moléculaires conduisant à la survenue de cette maladie héréditaire autosomique récessive sont désormais bien connus. Elle peut être la conséquence d'une mutation des gènes *FGF23*, *KLOTHO* ou *GALNT3* ⁴⁰. Les patients atteints présentent des calcifications sous cutanées de croissance progressive, apparaissant généralement dans l'enfance, et volontiers localisées en regard des articulations. Pouvant atteindre un volume très important (jusqu'à 1.5 kg), elles peuvent gêner la mobilité articulaire. Sur le plan moléculaire, les mutations causant cette pathologie sont responsables d'une perte de régulation de l'homéostasie du phosphore, avec altération des phénomènes d'absorption digestive et d'excrétion urinaire de phosphore ⁴⁰.

Ces deux pathologies illustrent le rôle de l'hyperphosphatémie dans la survenue des calcifications cutanées.

- Rôle de l'environnement calcique tissulaire

La présence d'un gradient calcique croissant est bien décrite entre les couches inférieures et supérieures de l'épiderme ⁴⁸⁻⁵⁰ (Figure 3).

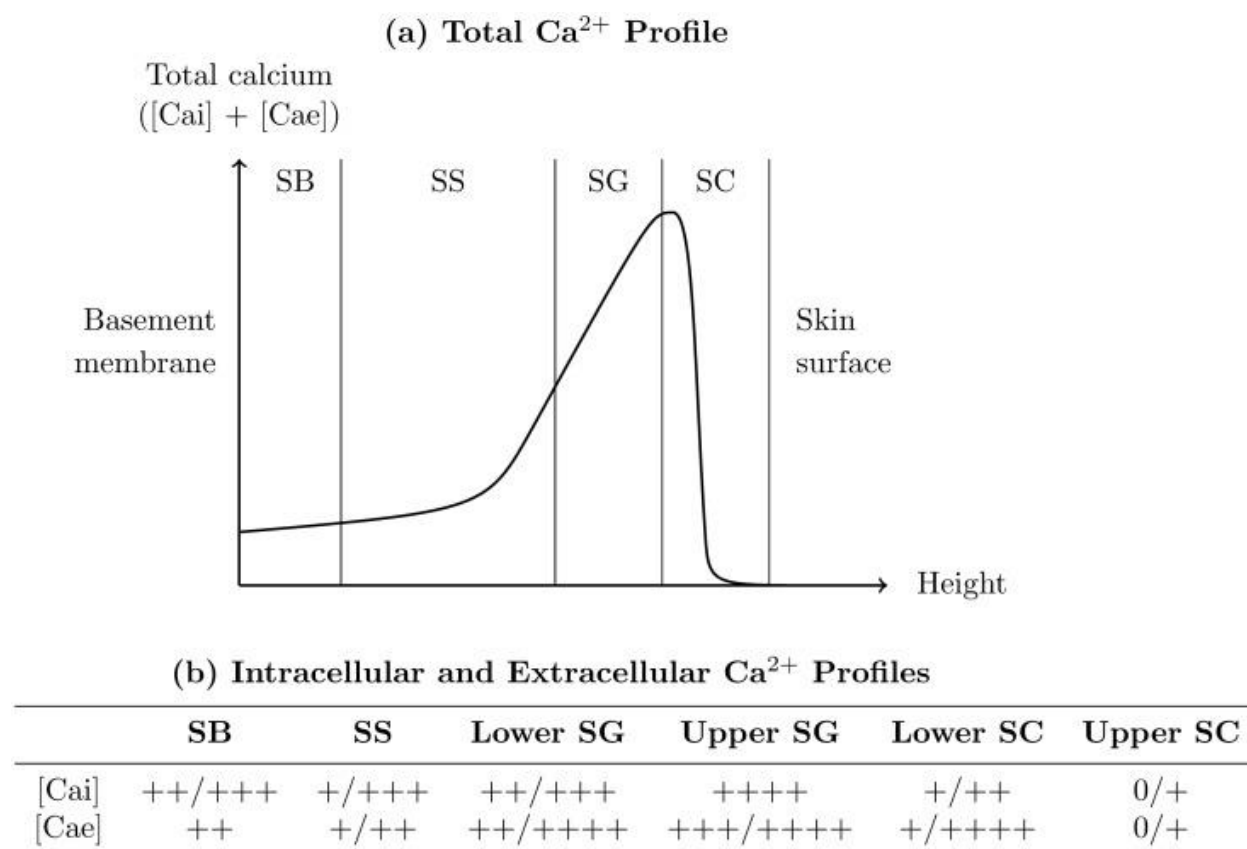


Figure 3. Distribution calcique au sein de l'épiderme. (a) Répartition au sein des différentes couches épidermiques *stratum basale* (SB), *stratum spinosum* (SS), *stratum granulosum* (SG), *stratum corneum* (SC). (b) Répartition du calcium intra et extracellulaire selon la couche de l'épiderme. D'après Adams et al. *PloS One*, 2015.

Si aucune étude ne rapporte l'existence d'un gradient calcique dermique, son existence n'est pas exclue ; celui-ci pourrait être perturbé par le remodelage dermique induit par les dermatoses et pourraient contribuer à la genèse des calcifications cutanées.

- Phosphatase alcaline

Il s'agit d'une enzyme ubiquitaire, liée aux membranes cellulaires. Elle est impliquée dans la minéralisation en augmentant la concentration locale de phosphate inorganique et en diminuant la concentration de PPi extracellulaire (destruction de PPi en phosphate) ⁵¹.

- Voie des ostéoblastes et des ostéoclastes

Le réseau de signalisation “receptor activator of NF-kappaB” (RANK) / “receptor activator of NF-kappaB ligand” (RANKL) / ostéoprotégérine (OPG) a un rôle clé dans l'homéostasie osseuse et a été impliqué dans les calcifications vasculaires. RANKL/RANK régule positivement la formation des ostéoclastes ; au contraire l'OPG protège le squelette d'une résorption osseuse excessive en empêchant la liaison de RANK à RANKL ⁵².

Les ostéoclastes ont été retrouvés en périphérie de calcifications au cours de la dermatomyosite ⁵³. Ces calcifications sont fortement associées au risque d'acro-ostéolyse et d'ostéoporose dans la sclérodermie systémique ⁴¹. De plus, il a été montré que l'IL-1 stimulait l'ostéoclastogénèse via le TNF alpha en induisant la différenciation de RANK-L par les cellules stromales ⁵⁴. Toutes ces données pourraient suggérer l'implication potentielle des ostéoclastes et de la voie RANK/RANKL dans la formation des calcifications. Cette activité des ostéoclastes pourrait notamment être une des sources d'augmentation de calcium et de phosphate extracellulaire, par résorption osseuse.

La figure 4 résume le rôle des protéines précédemment citées et de cette voie cellulaire.

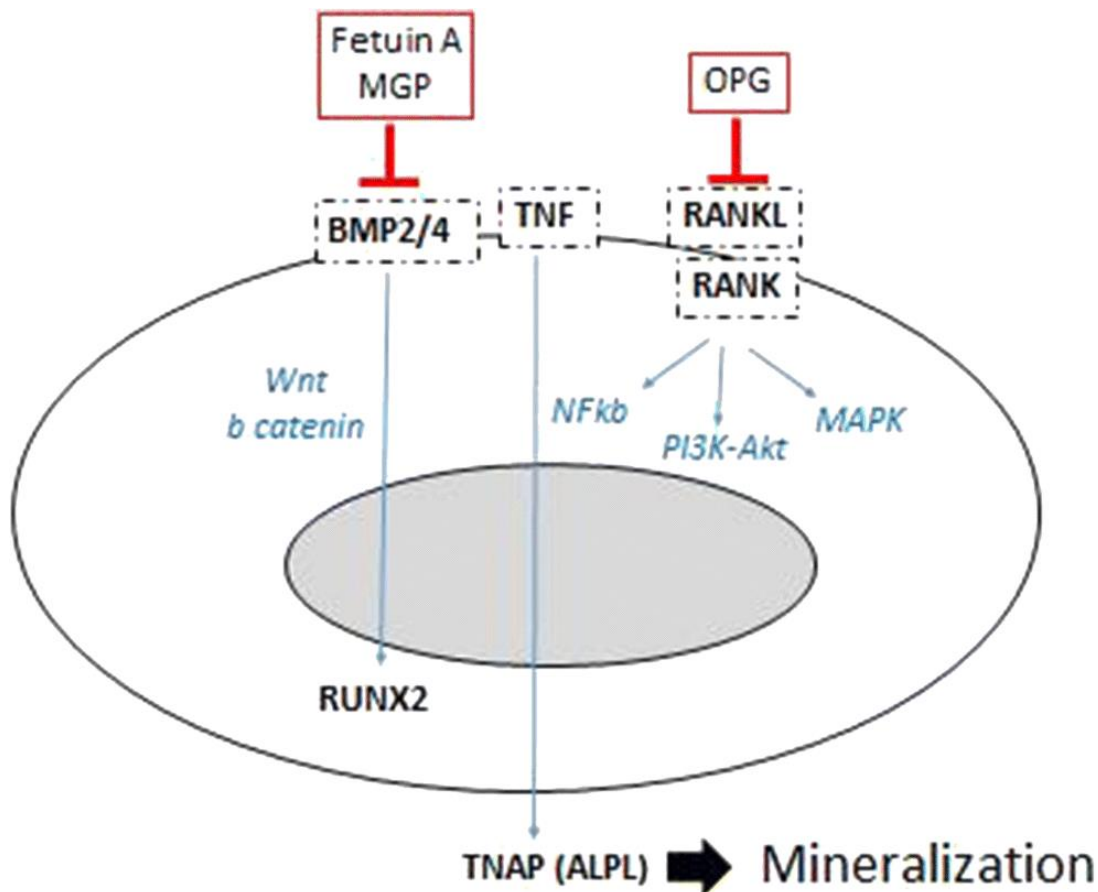


Figure 4. Schéma de l'induction des voies ostéogéniques au cours des calcifications cutanées ectopiques. Divers régulateurs protéiques régissent la minéralisation osseuse. La fétuine-A et la MGP inhibent la différenciation et la minéralisation ostéogéniques en partie par la régulation négative de la signalisation BMP 2/4. La signalisation BMP augmente la différenciation ostéogénique via RUNX2. Le TNF (cytokine pro-inflammatoire) augmente l'expression du promoteur de minéralisation TNAP (phosphatase alcaline tissulaire non spécifique). L'OPG agit comme un récepteur leurre pour RANK, inhibant ainsi l'ostéoclastogénèse et favorisant la minéralisation. D'après Richardson et al. *Curr Rheumatol*, 2020.

b) Élément diminuant la sursaturation

- Rôle du pH

Chez les rats urémiques, l'acidose métabolique, même à un degré modéré, entraîne une diminution de la formation des calcifications vasculaires pour diverses raisons, dont la régulation des taux de phosphore et de parathormone, mais aussi en augmentant la solubilité du

calcium et du phosphate ^{55,56}. De plus, in vitro, l'acidose métabolique diminue la production ostéoblastique de phosphatase alcaline, stimule la production de MGP et augmente l'activité des ostéoclastes ⁵⁷.

- Eléments inhibant la cristallisation

- ✓ Pyrophosphates inorganiques

Les pyrophosphates inorganiques (PPi) sont des inhibiteurs bien connus de la minéralisation, empêchant le calcium de cristalliser avec le phosphate. Ils sont composés de deux molécules de phosphate inorganique joints par une liaison ester hydrolysable ⁵⁸. Les PPi se lient également fortement à la surface des cristaux minéraux phosphocalciques et bloquent ainsi leur croissance. Par ailleurs ils peuvent induire l'expression de l'ostéopontine, autre inhibiteur de la minéralisation, dans les ostéoblastes via la voie de signalisation MAP Kinase ⁵⁹. Le taux de PPi est diminué dans le pseudoxanthome élastique, maladie génétique autosomique récessive causée par des mutations du gène « ATP-binding cassette subfamily C member » (ABCC6), qui mène à des calcifications tissulaires cutanées, ophtalmiques et artérielles ; en effet le relargage de l'ATP médié par ABCC6 serait responsable de 60 à 70% des PPi circulants ⁶⁰. Enfin, dans les calcifications cutanées associées à la sclérodémie systémique, une diminution significative du taux plasmatique de PPi a également été rapportée ⁶¹.

- ✓ Matrix-gla-protéine

La matrix-gla-protéine (MGP) est une protéine de la matrice extracellulaire riche en acide gamma-carboxy-glutamique (Gla), un acide aminé liant le calcium. Cette protéine est donc connue pour être un inhibiteur clé des calcifications vasculaires et tissulaires ⁶². La vitamine K est nécessaire à la carboxylation de la MGP, entraînant un changement conformationnel nécessaire à sa fonction. Ainsi les anti-vitamines K, par l'inhibition de cette carboxylation résultant en une MGP non fonctionnelle, auraient un effet pro-calcifiant. La liaison sélective et étroite de la MGP avec le calcium permettrait d'empêcher la croissance des dépôts minéraux phosphocalciques ⁶³. La MGP se lie aussi avec la Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP2) et inhibe ainsi la différenciation cellulaire en ostéoblastes, dont le rôle a été suspecté dans les

calcifications vasculaires ⁶⁴. Le stress oxydatif pourrait inhiber la vitamine K, résultant en une MGP non fonctionnelle ⁶⁵. En outre, l'environnement ionique a une influence sur le fonctionnement de la MGP : le magnésium et le phosphate diminuent ainsi sa liaison aux dépôts minéraux phosphocalciques ⁶³. Il est cependant à noter que ces mêmes ions pourraient, in vivo, diminuer la minéralisation en augmentant la solubilisation des dépôts calciques, comme montré au cours d'un régime riche en magnésium dans un modèle murin de pseudoxanthome élastique ; ces résultats reposeraient sur le fait que le phosphate de magnésium est plus soluble que le phosphate de calcium, favorisant l'élimination d'hydroxyapatite ⁶⁶.

✓ Fétuine A

La Fétuine A est une protéine plasmatique dérivée du foie qui agit comme potentiel inhibiteur de la minéralisation ectopique ; des taux sériques bas ont été associés à des calcifications vasculaires et des tissus mous. Elle inhibe la formation des dépôts minéraux en se liant aux sels de phosphore-calcium, et inhibe la différenciation cellulaire en ostéoblaste via la voie de signalisation BMP ⁶⁷. Belloli et al. a ainsi rapporté des taux de Fétuine A plus bas chez les patients présentant des calcifications cutanées au cours de la sclérodémie systémique que chez ceux présentant une sclérodémie sans calcifications ⁶⁸. Par ailleurs, dans la dermatomyosite juvénile, Marhuag et al. a remarqué une corrélation positive entre l'âge et les taux de Fétuine A, beaucoup plus bas chez les enfants ⁶⁹. Ces taux bas, nécessaires pour permettre la croissance du squelette, expliqueraient pourquoi les patients atteints de dermatomyosite juvénile sont plus à risque de calcifications cutanées que les patients plus âgés.

✓ Ostéopontine

L'ostéopontine est exprimée par les fibroblastes aux sites de minéralisation ectopique ⁵². Elle lierait le collagène et l'empêcherait d'interagir avec l'hydroxyapatite ⁷⁰. Elle pourrait également promouvoir la dissolution des minéraux en acidifiant l'environnement extracellulaire, par le biais de l'induction de l'anhydrase carbonique dans les monocytes ⁷¹.

c) Eléments favorisant la nucléation

- Structures tissulaires

Les dépôts phosphocalciques cutanés sont plus susceptibles de se déposer sur certaines structures tissulaires. Les fibres dermiques, en particulier les fibres de collagène et les fibres élastiques sont ainsi aptes à jouer le rôle de centre nucléateur ^{72,73}. Ces fibres contribuent d'ailleurs à la formation des calcifications physiologiques, comme le tissu osseux ⁷³.

Le caractère pro-calcifiant du collagène est intimement lié au phénomène de glycation, réaction non enzymatique qui se produit entre un glucide et une molécule disposant d'un groupement amine libre, telle que le collagène ⁷⁴. Certains travaux tendent ainsi à montrer une relation intime entre les produits glyqués et la présence de calcifications ⁷⁵.

Les polysaccharides jouent un rôle de nucléateur pour les cristallites d'apatite ⁷⁵. En effet, les groupes fonctionnels ($-\text{COOH}$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$) des polysaccharides sont capables de chélater les cations divalents Ca^{2+} et de former des liaisons hydrogène avec les groupements $(\text{PO}_4)^{3-}$ et les molécules d'eau présents à la surface du minéral ⁷⁵.

En ce qui concerne les fibres élastiques, elles constituent également un support de choix à la formation des dépôts phosphocalciques ⁷². Bien que l'origine d'un tel tropisme demeure inexplorée, la chronologie de constitution de ces dépôts sur les fibres élastiques a été étudiée in vitro, montrant que les dépôts se forment initialement sur les micros fibrilles de glycoprotéines avant de gagner la structure globulaire centrale composée d'élastine ⁷².

- Dentine matrice protéine 1

Cette protéine initie la minéralisation pendant la phase finale de différenciation des ostéoblastes. Son expression a été retrouvée dans des calcifications cutanées dystrophiques ⁷⁶.

- Ostéonectine

Il s'agit d'une glycoprotéine jouant un rôle essentiel dans la minéralisation osseuse. Elle a été impliquée dans les réparations et le remodelage tissulaires ⁵². Son expression a été retrouvée augmentée dans les parois vasculaires au cours de la sclérodermie systémique ⁷⁰.

- Enzyme poly(ADP-ribose) polymérase

Surexprimée dans la réponse aux dommages de l'ADN, cette enzyme pourrait jouer un rôle important dans la nucléation des dépôts phosphocalciques. Elle catalyse la production de chaînes de polyADP-ribose (PAR), qui ont une haute affinité pour les ions calciques et permet la liaison des complexes PAR-calcium aux fibrilles de collagène. Par ailleurs, cette enzyme stimule le facteur de transcription RUNX2 qui induit la différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires en ostéoblastes et contribue ainsi à la genèse des calcifications vasculaires ⁷⁰.

3) Localisation tissulaire des calcifications cutanées

La littérature rapporte diverses localisations tissulaires des calcifications cutanées (Figure 5): dermiques, vasculaires, péri-ecrine, péri-adipocytaire... ⁷⁷. Les raisons pour lesquels les calcifications se forment préférentiellement sur certaines zones tissulaires cutanées sont peu explorées. Un environnement tissulaire local favorable contenant des supports organiques pro-calcifiant peut-être suspecté, tel que la présence accrue de phospholipide, expliquant la localisation péri-adipocytaire.

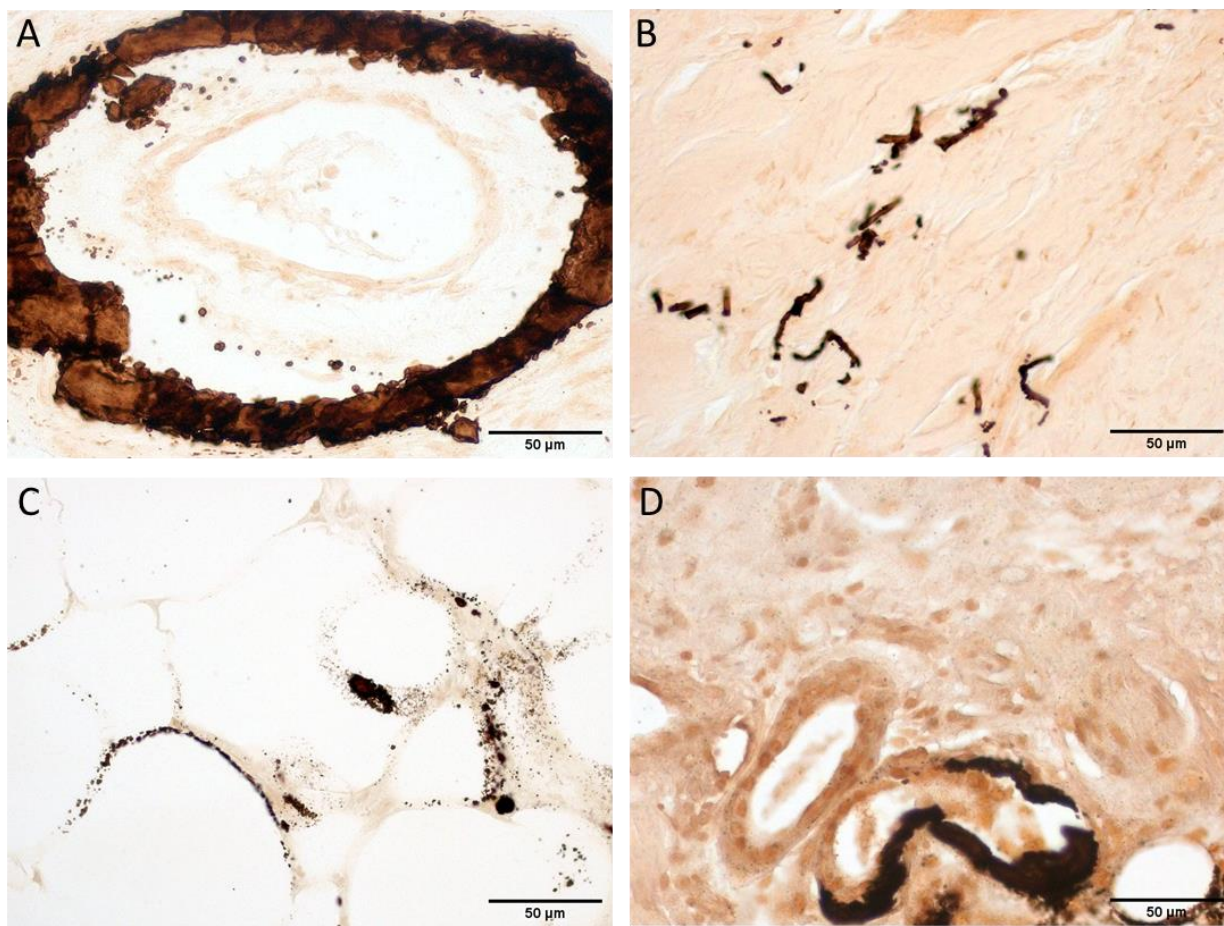


Figure 5. Différentes localisations tissulaires des calcifications cutanées au cours de la calciphylaxie, microscopie optique, coloration de Yasue ; les calcifications apparaissent en noir. A. Calcifications de la paroi d'un vaisseau dermique. B. Calcifications des fibres élastiques dermiques. C. Calcifications de la paroi des adipocytes. D. Calcifications de la zone basale des glandes sudoripares.

Cependant, bien que de nombreuses structures cutanées puissent être calcifiées, les calcifications s'observent le plus souvent dans des zones particulièrement riches en fibres élastiques que sont la matrice extracellulaire dermique et les parois des vaisseaux cutanés ^{78,79}.

Ce tropisme vis-à-vis des fibres élastiques est bien décrit dans les pathologies cardiovasculaires, et a déjà été exploré in vitro, permettant l'identification de potentiel noyaux de nucléation phosphocalciques au sein de ces fibres ⁷². Ce tropisme illustre là encore l'existence de noyaux de nucléation spécifique des dépôts phosphocalciques sur ces dernières, possiblement révélés par les remodelages post inflammatoires ou traumatiques précédemment décrits et détaillés dans le paragraphe suivant.

4) Lien entre inflammation et calcifications cutanées

De nombreux travaux et descriptions cliniques suggèrent un lien entre inflammation et calcifications. Cependant, à ce jour, celui-ci demeure partiellement compris. Des hypothèses sont avancées par certains auteurs, suspectant, au cours des phénomènes inflammatoires, des altérations de l'élastine (dermique ou des parois vasculaires) par des métallo protéinase (MMP), favorisant les dépôts phosphocalciques ⁸⁰⁻⁸². Dans la calcinose tumorale familiale (précédemment décrite), il est d'ailleurs suspecté que le tropisme des calcifications vis-à-vis du tissu cutané soit lié au MMP dermique. Leur expression serait en effet favorisée par le FGF7, une protéine produite dans le derme en réponse à l'hyperphosphatémie. Ce mécanisme pourrait en partie expliquer que les calcifications ne se forment que dans la peau dans cette pathologie, et pas dans d'autres organes, alors même que l'hyperphosphatémie affecte tous les tissus ⁴⁰.

En outre, une fois constituées, les calcifications pourraient être elles-mêmes à l'origine d'une réaction inflammatoire qui pourrait entretenir ce phénomène, constituant un « cercle vicieux » inflammation-calcifications (Figure 6).

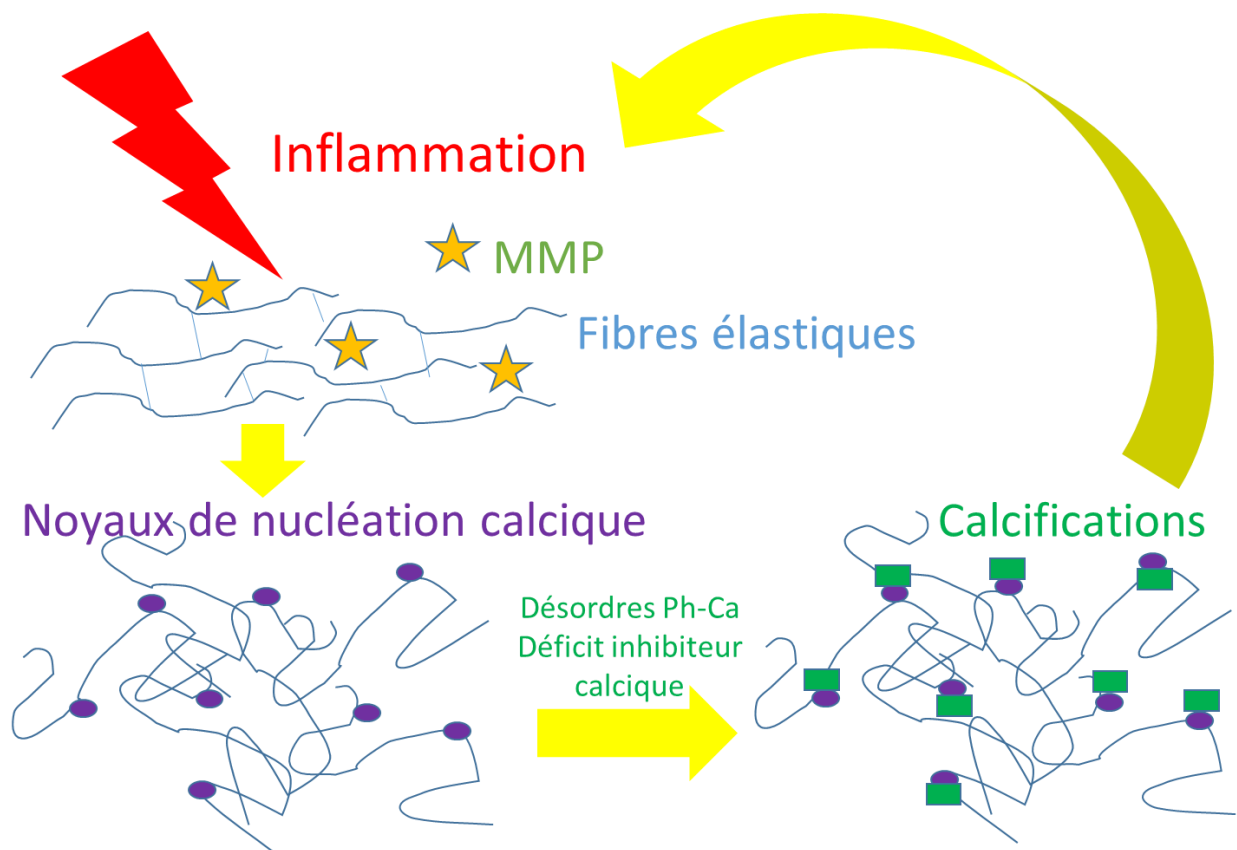


Figure 6. Schématisation du lien entre inflammation et calcifications cutanées. Les phénomènes inflammatoires pourraient être à l'origine d'altérations et de modifications structurelles des fibres élastiques dermiques et vasculaires, les rendant propice aux dépôts de calcium et phosphore. La formation des calcifications serait favorisée par des désordres métaboliques (calcifications métastatiques), ou non (calcifications dystrophiques). Une fois constituées, ces calcifications seraient également source d'inflammation, rendant le lien chronologique entre inflammation et calcifications difficile à établir.

Ces hypothèses sont également appuyées par la présentation clinique observée chez certains patients, où la survenue de calcifications est associée à une inflammation cutanée (Figure 7).

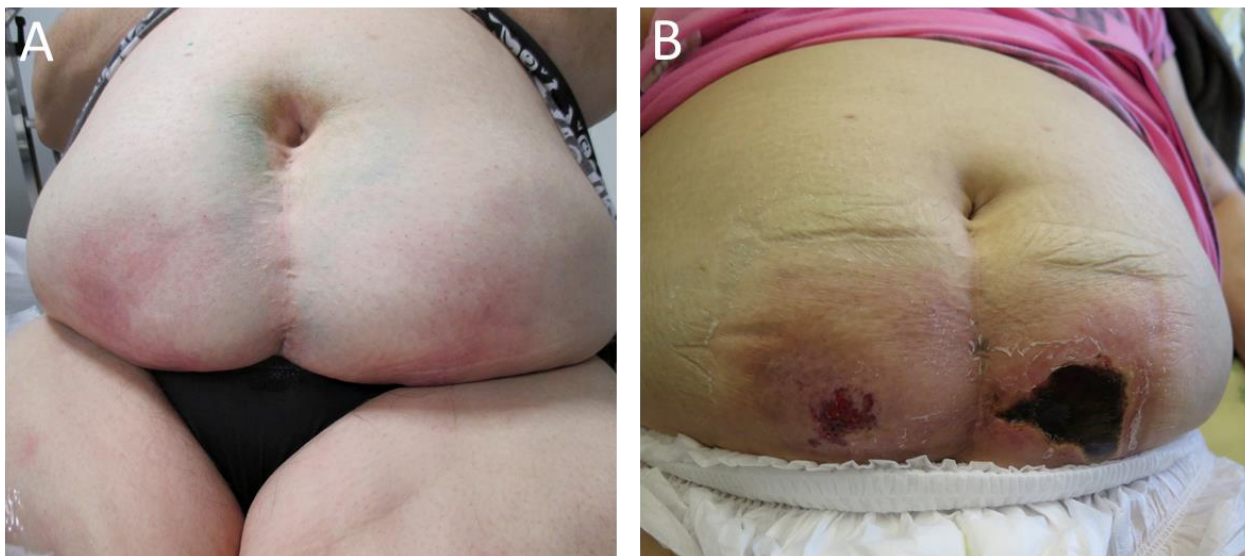


Figure 7. Patiente présentant une calciphylaxie urémique. A. Lésions initiales, avec placards inflammatoires de l'abdomen. B. Evolution des lésions avec apparition de zone de nécrose. *(Cas rapporté par le Dr Patricia Senet)*

D'autres données de la littérature viennent appuyer ce lien entre calcifications et inflammation ; ainsi, au cours de la dermatomyosite, l'inflammation chronique a été associée à des taux bas de Fétuine A, protéine inhibant les calcifications ⁶⁸. Par ailleurs, des travaux portant sur la minéralisation osseuse ont montré que l'interleukine 1, cytokine inflammatoire, inhibe l'action du PPI, et joue donc probablement un rôle important dans la minéralisation des chondrocytes ^{83,84}.

Enfin, d'autres pathologies non dermatologiques, en particulier cardiovasculaires, dans lesquelles un lien inflammation-calcification a déjà été mis en évidence, viennent appuyer cette hypothèse ⁸⁵. L'inflammation chronique serait ainsi à l'origine de la dédifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires vers un phénotype de cellule calcifiante, produisant alors des vésicules chargées en calcium et phosphore ; celles-ci entraîneraient secondairement la formation de dépôts phosphocalciques au sein de la limitante élastique des vaisseaux.⁸⁶

5) Traitements des calcifications cutanées

De nombreuses études évaluent diverses thérapeutiques dans le traitement des calcifications tissulaires. Toutefois, leur efficacité est généralement limitée ⁸⁷. Les thérapeutiques suivantes sont les plus souvent rapportées.

a) *Bisphosphonates*

Les bisphosphonates sont des analogues des pyrophosphates; ils se lient aux cristaux phosphocalciques et inhibent leur croissance en mimant l'action du PPI ⁸⁸. Ils agissent également en inhibant l'activité des ostéoclastes, réduisant ainsi le turn-over du calcium et diminuant le taux de calcium circulant, potentielle source de minéralisation ectopique ⁸⁹. Plusieurs études rétrospectives ont évalué l'efficacité des bisphosphonates sur les calcifications cutanées, principalement dans le cadre de la dermatomyosite ⁹⁰. Dans ces études, le pamidronate et l'alendronate étaient les plus souvent utilisés avec un taux de réponse partielle allant de 50% à 100% et un taux de réponse complète de 0 à 33% ^{88,91}.

b) *Thiosulfate de sodium*

Le thiosulfate de sodium (TSS) a montré une action sur la diminution des calcifications vasculaires chez des rats urémiques ⁹² et sur la réduction de formation de cristaux calciques dans des cultures de chondrocytes ⁹³. En 2013, Nigwekar et al. ont publié une série de 172 patients présentant une calciphylaxie urémique traitée par TSS en intraveineux, permettant une résolution de la maladie chez 26% des patients, et une amélioration pour près de 50% d'entre eux ⁹⁴.

Plusieurs mécanismes d'action du TSS sont proposés et débattus : chélation du calcium et solubilisation en thiosulfate de calcium, propriétés vasodilatatrices, anti-inflammatoires, induction d'une acidose, induction d'inhibiteurs de minéralisation comme la MGP ... ^{95,96}. Deux études de sept patients ont évalué l'efficacité du TSS intraveineux au cours de dermatomyosite ou de sclérodémie systémique ; aucune amélioration objective n'était retrouvée et l'amélioration de la douleur n'était présente que chez deux patients ^{43,97}. Par ailleurs, le TSS topique ne permettait pas d'amélioration des calcifications cutanées chez cinq patients présentant une dermatomyosite ⁹⁸. Le TSS en injection intra-lésionnel semble plus intéressant. En effet, une étude prospective de cinq patients présentant des calcifications sur sclérodémie systémique a mis en évidence un taux de réponses partielles de 100% au TSS en

injection intra-lésionnel, avec pour tous les patients une diminution de la taille de plus de 50%⁹⁹.

c) Tétracycline

Les tétracyclines sont des antibiotiques qui ont la capacité de lier les cations divalents dont le calcium; leur action anti-calcifiante a été montrée in vitro et sur des calcifications de bio prothèses de rats^{100,101}. Une étude rapporte ainsi l'utilisation de minocycline chez 9 patients présentant des calcifications cutanées sur sclérodermies systémiques ; 8 d'entre eux présentaient une réponse partielle avec amélioration de l'inconfort, de l'inflammation locale et cicatrisation des ulcérations¹⁰².

d) Traitements physiques

- Chirurgie : elle est réalisée à froid et peut permettre, pour les calcifications bien limitées, une excision complète. Pour les calcinoses plus étendues le principe est celui d'une chirurgie de « débulking », avec exérèse des principaux dépôts symptomatiques¹⁰³. Une autre technique décrite est le « microdrilling » qui diminuerait le risque de complication en permettant une chirurgie moins lourde: une petite incision est pratiquée puis une fraise détruit les dépôts calciques qui sont ensuite éliminés à l'aide de sérum physiologique¹⁰⁴.

- Laser de dioxyde de carbone (CO₂) : Il permettrait une destruction précise physique de la cible traitée en épargnant les tissus sains et en minimisant le risque de saignement¹⁰⁵.

- Lithotripsie extracorporelle : elle est utilisée en routine pour éliminer les lithiases urinaires. Plus récemment, elle a été développée dans le traitement des tendinites calcifiantes¹⁰⁶.

6) Diversité structurale des calcifications cutanées

Les calcifications cutanées peuvent présenter une grande variabilité structurale. Celle-ci est déjà suggérée par l'analyse macroscopique de ces calcifications (Figure 8), mais son exploration nécessite l'utilisation d'outils permettant une analyse structurale de haute résolution, comme la microscopie électronique en transmission et microscopie électronique à balayage.

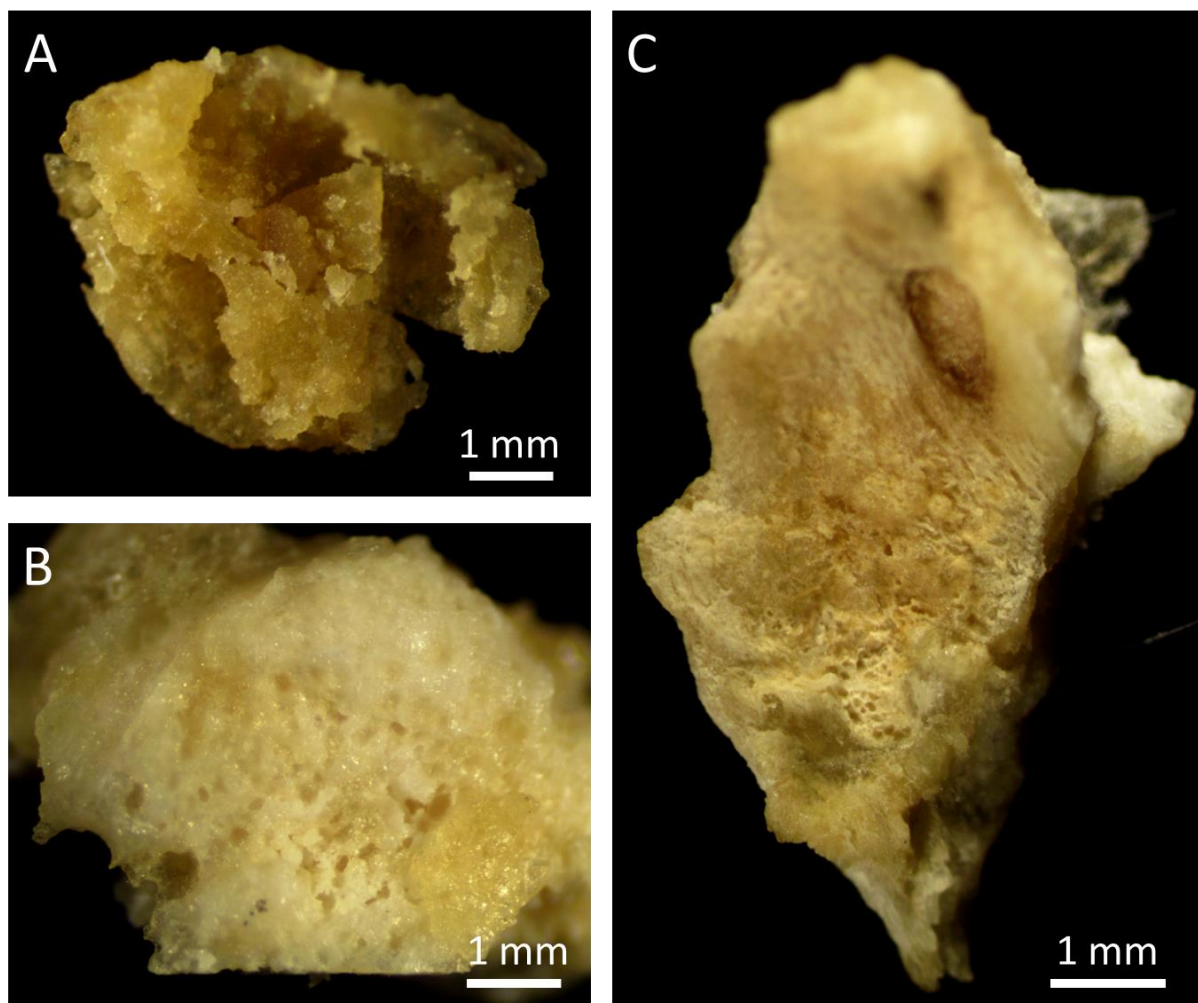


Figure 8. Aspect macroscopique de calcifications retrouvées au sein d’ulcère de jambe, extraite au cours du soin.

La microscopie électronique en transmission (MET) est la plus souvent rapportée dans l’étude des calcifications cutanées et de leur environnement tissulaire ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Cette technique repose sur l’interaction des électrons avec la matière et la détection des électrons ayant traversé l’échantillon, générant une image ¹¹⁰. Pour cette analyse, les échantillons de peau doivent être fixés dans une solution de glutaraldehyde et non de formol, ne permettant pas de réaliser cette technique sur les mêmes échantillons que ceux de microscopie optique, raison pour laquelle nous n’avons pas utilisé cette technique dans nos études.

La microscopie électronique à balayage (MEB déjà définie plus haut) couplée à la spectroscopie de rayons X à dispersion d’énergie (EDX) permet de réaliser à la fois une analyse ultra-structurale des calcifications mais aussi de décrire leur localisation à l’échelle sub-cellulaire. La MEB est également rapportée dans l’étude des calcifications cutanées, contrairement à la MET ^{111,112}.

Nos observations en MEB sont effectuées au Laboratoire de Physique des Solides sur un microscope Zeiss SUPRA55VP/Gemini à Orsay fonctionnant à 0,5-30 kV. L'analyse se fait sur coupes de biopsies cutanées déparaffinées de 2 μm d'épaisseur, apposées sur une lame de type MIRR (Kevley Technologies, Tienta Sciences, Indianapolis) ³⁸. Nous utilisons donc les mêmes échantillons que ceux utilisés pour la microscopie optique.

Lors de l'analyse en MEB, un faisceau d'électrons (électrons primaires) vient balayer la surface de l'échantillon qui, en réponse, va réémettre des électrons secondaires. Ces derniers vont être captés par plusieurs détecteurs permettant l'obtention d'une image topographique de la surface. Ces électrons secondaires sont issus des interactions entre le faisceau d'électron incident et la matière ²³. L'image est ainsi obtenue séquentiellement point par point en déplaçant le faisceau d'électrons primaires sur la surface de l'échantillon.

En outre, l'interaction entre les électrons du microscope électronique et les atomes de l'échantillon conduit à l'ionisation des atomes alors excités, qui se retrouvent dans un état instable. Un processus de désexcitation va alors se produire, qui aboutit à des transitions électroniques en cascade (phénomène détaillé dans le paragraphe suivant portant sur la fluorescence X). Il en résulte une émission d'un ensemble de raies X énergétiquement caractéristiques de l'atome émetteur car chaque élément chimique possède des niveaux électroniques caractéristiques. C'est le principe de la microanalyse EDX ²⁵.

La MEB apporte des informations précises sur l'ultrastructure des calcifications cutanées, révélant leur diversité morphologique, allant de la plaque micrométrique (Figure 9A) à la sphérule nanométrique (Figure 9B). L'EDX, outil couplé au MEB, vient appuyer ces analyses, en confirmant la nature phosphocalcique des dépôts, en particulier ceux de très petites tailles, non vus sur les colorations usuelles de microscopie optique (Figure 9D).

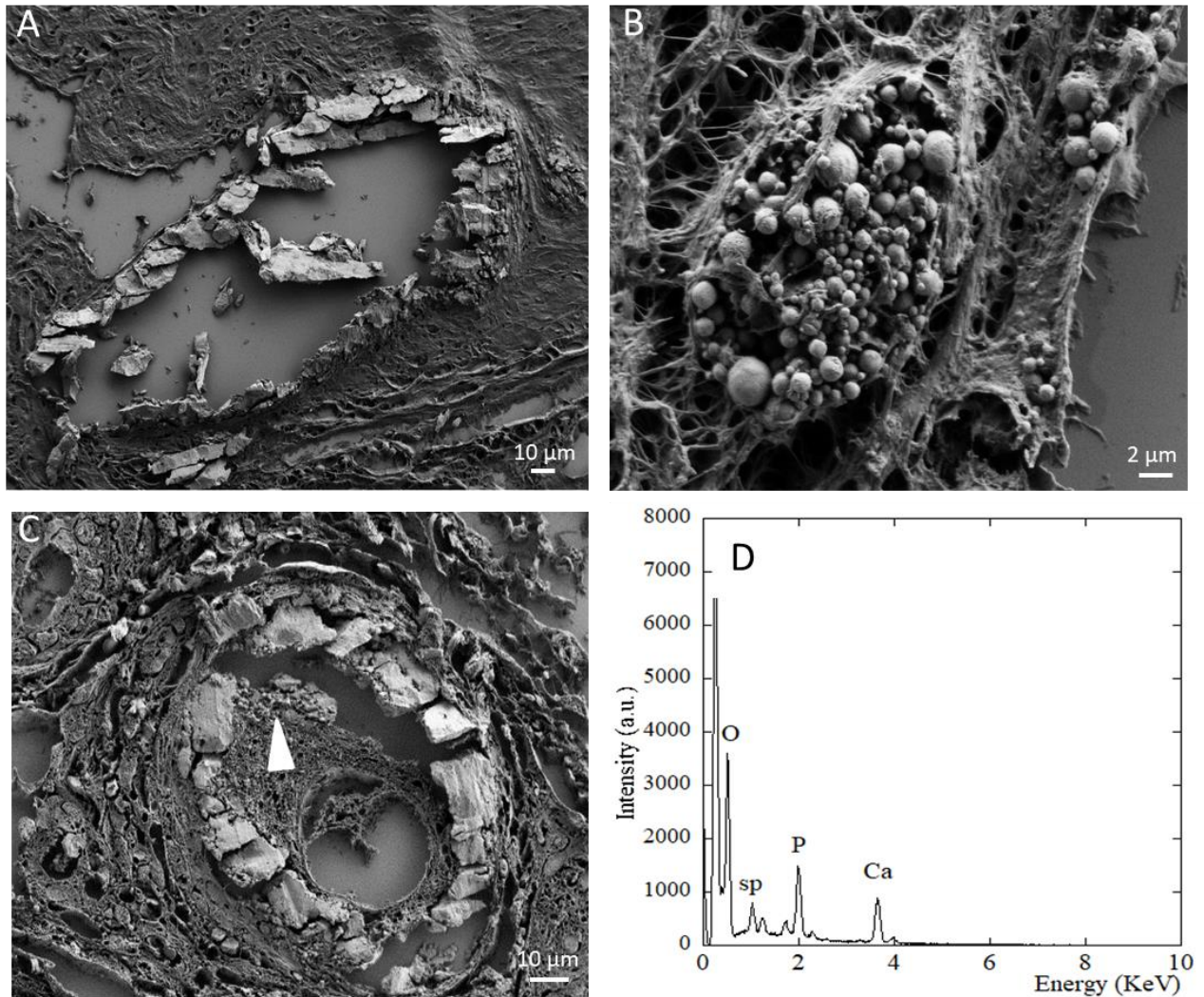


Figure 9. Aspect ultra-structural des calcifications cutanées en MEB, exemple de la calciphylaxie urémique A. Calcifications vasculaires en plaques. B. Multiples sphérules nanométriques adjacents à un adipocyte. C. Calcifications vasculaires en plaque ; la tête de flèche désigne de multiples sphérules dont la coalescence semble former les plaques précédemment citées. D. Spectre EDX permettant de confirmer la composition phospho (P) calcique (Ca) de ces sphérules.

7) Diversité chimique des calcifications cutanées

Les calcifications cutanées comportent deux types de composés principaux : des composés inorganiques, qui contiennent principalement du Calcium et du Phosphore et des composés organiques protéiques. Les calcifications cutanées sont acellulaires, mais volontiers associées à

des infiltrats inflammatoires périphériques pluricellulaires ⁵² et parfois à des ostéoclastes en périphérie des calcinose les plus volumineuses ⁵³.

Je vais maintenant présenter brièvement quelques éléments de chimie associés à la partie inorganique puis expliquer le principe des techniques de caractérisation que j'ai mis en œuvre dans ma recherche.

a) Eléments de chimie relatifs à la partie inorganique des calcifications cutanées

Le phosphore et le calcium s'organisent le plus souvent dans la peau sous forme d'hydroxyapatite (HA) ¹¹³ dont la formule stœchiométrique est la suivante : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ¹⁰⁶.

Lorsque l'on considère les propriétés physicochimiques de l'HA au sein de calcifications physiologiques comme le tissu osseux ou l'émail dentaire on perçoit une variabilité dans leur composition chimique et structurale ¹¹⁴. Cette variabilité est étroitement liée à de multiples substitutions chimiques rendues possibles en raison d'une grande adaptabilité à la substitution ¹¹⁵. Ainsi, des ions carbonates sont susceptibles de prendre la place des anions phosphates $(\text{PO}_4)^{3-}$ ou hydroxydes OH^- . De cette présence des ions carbonates découle la dénomination carbapatite (CA). Ces substitutions modifient les propriétés de l'HA : ainsi, un fort taux de carbonatation la rend plus résistante aux attaques acides ^{116,117}. Des cations magnésium ou sodium, ainsi que des terres rares peuvent également se substituer aux cations calcium ¹¹⁸. Pour tenir compte de cette complexité, la formule suivante peut donc être proposée : $\text{Ca}_{10-x}\square_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}\square_x$ avec $0 \leq x \leq 2$ et où $\square$ indique la présence de lacunes ^{115,119,120}. Comme on peut le remarquer dans cette nouvelle formule stœchiométrique, la neutralité électrique du réseau cristallin est rendue possible par la création de lacunes cationiques et de lacune dans les sites des ions hydroxydes, représentées par la variable x. Par voie de conséquence, les apatites biologiques sont donc associées à un fort déficit en ions OH^- .

b) Exemples d'outils utilisés dans la caractérisation chimique des calcifications pathologiques

Dans la littérature, la caractérisation chimique des composés inorganiques et organiques des calcifications tissulaires est faite le plus souvent à l'aide des techniques de spectroscopies vibrationnelles et de la fluorescence X.

- Les techniques de spectroscopies vibrationnelles

Deux techniques de spectroscopies vibrationnelles, micro-spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) et micro-spectroscopie Raman sont utilisées dans ce travail de thèse. Elles permettent une connaissance précise de la composition chimique des calcifications pathologiques et la connaissance de leur répartition spatiale au sein de la biopsie à l'échelle du micromètre.

Le microscope infrarouge à transformée de Fourier que nous avons utilisé dans nos études (Spotlight 400 FT-IR imaging System, Perkin Elmer Life Sciences, situé à l'hôpital Tenon, service des Explorations Fonctionnelles) permet la réalisation d'une cartographie infrarouge sur une gamme de nombre d'onde allant de 4000 cm^{-1} à 700 cm^{-1} . La spectroscopie infrarouge, en explorant les liaisons entre atomes au sein des molécules nous indique les différents groupements moléculaires présents au sein du tissu biologique. Il existe deux catégories de vibrations :

- Les élongations qui correspondent à des variations de la longueur de liaison entre atomes,
- Les déformations qui impliquent une variation de l'angle entre deux liaisons atomiques.

A partir de ces vibrations sont obtenus des spectres correspondant à l'absorption du rayonnement en fonction du nombre d'onde. Ils sont exprimés en nombre d'onde (inverse de la longueur d'onde), compris entre 4000 cm^{-1} à 700 cm^{-1} . En ce qui concerne l'analyse, j'ai comparé mes données à des spectres de référence afin d'identifier les groupements moléculaires. L'analyse quantitative s'effectue à partir des intensités des différentes bandes d'absorption infrarouge ¹²¹.

La spectroscopie Raman est considérée, tout comme l'infrarouge, comme une spectroscopie vibrationnelle. Il s'agit en fait d'un cas particulier de diffusion lumineuse appelée diffusion inélastique, correspondant à une modification par le tissu de la fréquence de la lumière y circulant. Les informations obtenues par la mesure et l'analyse de cette modification de fréquence permettant, tout comme la spectroscopie infrarouge, de déterminer la phase chimique des calcifications ainsi étudiées.

Si certaines bandes Raman et infrarouge sont strictement superposables, il peut y avoir de grandes disparités de réponse entre les deux techniques (dépendant du caractère symétrique ou non de la molécule étudiée), leur conférant une complémentarité.

- La fluorescence X

En soumettant notre échantillon à un faisceau de photons (et non pas d'électrons comme c'est le cas de l'EDX), il est possible d'éjecter des électrons de cœur du cortège électronique (si leur énergie est suffisante) (flèche rouge figure 10a). L'atome est ainsi placé dans un état excité et pour revenir à son état initial, on assiste à un réarrangement du cortège électronique de l'atome qui s'effectue - soit par un mode non radiatif (flèche verte sur la figure 10b), correspondant à une émission d'électrons dénommé effet Auger, - soit par un mode radiatif associé à l'émission de photons (flèche noir sur la figure 13b) ^{33,122}.

La fluorescence X se réfère à la voie radiative. Le retour de l'atome dans son état initial est un processus complexe. Il dépend du numéro atomique de l'élément (Z) et met en jeu plusieurs électrons du cortège électronique de l'atome. Il existe ainsi différentes désexcitations électroniques, chacune d'elles étant associée à l'émission de photons dont l'énergie est spécifique à cette désexcitation. On observe donc non pas des photons d'une seule énergie mais un ensemble de photons d'énergies différentes, chaque énergie définissant une raie d'émission caractéristique de l'élément atomique présent dans le matériau.

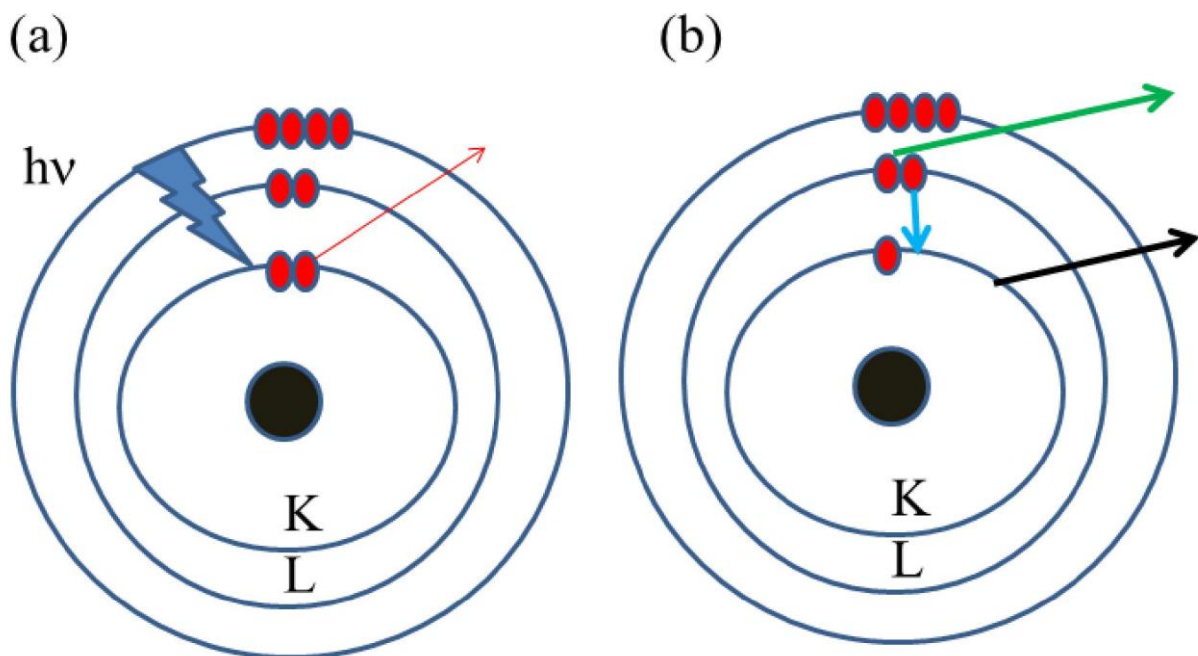


Figure 10. Schématisation des réarrangements du cortège électronique.

L'analyse (en termes d'amplitude et d'énergie) de cette collection de raies d'émission dénommée spectre d'émission permet donc de savoir quels sont les éléments présents au sein

du matériau. Plus précisément, l'énergie de la raie d'émission indique le numéro atomique de l'élément. La proportion de cet élément est donnée en analysant l'intensité de la raie d'émission¹²³. Il est possible d'irradier un échantillon dans son ensemble et donc d'établir sa composition élémentaire globale mais également d'obtenir une information sur la répartition spatiale des différents éléments détectables en le balayant point par point. Ces opportunités dépendent de la sonde utilisée et il convient de la sélectionner en fonction de la problématique médicale²⁶.

c) Exemples d'application de ces outils en dermatologie

Bien que ces outils soient utilisés dans l'étude des dépôts minéraux de différents organes, la littérature concernant l'étude de la composition chimique des calcifications cutanées via ces techniques est beaucoup plus rare.

Ainsi, Eidelman et al. ont analysé la composition de calcifications cutanées dystrophiques par FT-IR et MEB couplé à l'EDX chez six patients présentant une dermatomyosite, retrouvant la présence systématique de carbapatite¹²⁴. Franzen et al. ont retrouvé un résultat similaire en conduisant une analyse par FT-IR chez 14 patients présentant des calcifications dystrophiques de causes variées, retrouvant également de la carbapatite pour tous les patients¹²⁵.

Dans la calciphylaxie urémique, Kramann et al. ont analysé par EDX de 7 patients, et montré que les calcifications cutanées sont là aussi composées de calcium et phosphore selon un ratio compatible avec la présence d'HA¹²⁶.

La composition chimique des calcifications cutanées ne semble donc pas influencée par le type de calcifications (dystrophique versus métastatique par exemple), la présence d'apatite étant toujours rapportée, soit sous forme d'hydroxyapatite, soit sous sa forme carbonatée (carbapatite). Une seule étude ne rapporte pas la présence d'apatite dans la peau, en montrant la présence d'oxalate de calcium et de dolomite ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) au cours de calcifications cutanées associées à la sarcoïdose¹²⁷. Toutefois, ce résultat n'a pas été retrouvé dans une étude plus récente, identifiant par EDX la présence de calcium et de phosphore en périphérie des granulomes sarcoïdiques (l'absence d'analyse spectroscopique ne permettant pas d'avoir plus d'information)¹²⁸.

Le tableau II résume la nature et la formule chimique des calcifications cutanées rapportées dans la littérature au cours de diverses dermatoses.

Pathologies	Type de calcifications	Dénominations	Formules
Calciophylaxie urémique	Métastatique	Hydroxyapatite ¹²⁶	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Sarcoïdose	Métastatique	Oxalate de calcium Dolomite ¹²⁷	$\text{Ca}(\text{COO})_2, \text{H}_2\text{O}$ $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$
Sclérodermie systémique et dermatomyosite	Dystrophique	Carbapatite ¹²⁴	$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4^{2-})_x \text{ ou } \text{CO}_3^{2-})_x (\text{OH})_{2-x} \text{ avec } 0 \leq x \leq 2$

Tableau II. Nature et formule chimique des calcifications cutanées au cours de diverses dermatoses.

De façon assez remarquable, et contrairement aux données rapportées dans la peau, une importante diversité chimique a été décrite dans d'autres organes : différents polymorphes de carbonate de calcium ont par exemple été identifiés dans les calculs pancréatiques, biliaires, salivaires et dans le foie ¹²⁹. La faible diversité de type chimique de calcifications identifiée dans la peau pourrait être liée au fonctionnement du tissu cutané lui-même, mais aussi simplement à une faible exploration de la composition de ces calcifications. Pourtant, une meilleure compréhension de la variété chimique des calcifications cutanées aiderait probablement à comprendre la physiopathologie de ces dermatoses, ainsi que les options thérapeutiques. En effet, des études ont montré que la caractérisation chimique précise des calcifications tissulaires peut guider le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des patients. Par exemple, au cours de la maladie lithiasique rénale, un taux élevé de carbonate dans la carbapatite indique une pathologie lithiasique associée à un processus infectieux ¹¹⁷.

Nous allons maintenant voir l'application des outils précédemment décrits à la caractérisation physico-chimiques des calcifications au cours de quatre dermatoses calcifiantes. Ces résultats, portant sur des calcifications métastatiques et dystrophiques illustrent l'intérêt de l'utilisation de ces techniques. En outre, les derniers résultats présentés aborderont l'apport de ces techniques dans la caractérisation de dépôts cutanés exogènes, autre versant de mes thématiques de recherche.

II. RESULTATS

1) Localisation, morphologie et composition chimique des calcifications cutanées au cours de la calciphylaxie (*article publié dans le JAMA Dermatology*)

La calciphylaxie urémique touche jusqu'à 4 % des patients atteints d'insuffisance rénale terminale. Elle est associée à une morbi-mortalité importante et à ce jour, les options thérapeutiques sont extrêmement limitées.

Cette pathologie est associée à la présence de calcifications tissulaires, en particulier cutanées (à la fois interstitielles et vasculaire), entraînant des nécroses cutanées étendues. Le sexe féminin, le diabète, l'obésité, des taux sériques élevés de calcium, de phosphore et d'hormone parathyroïdienne et la prise d'anti vitamine K sont associés à un risque accru de développer la maladie.

Malgré des descriptions cliniques et histologiques bien caractérisées, la physiogénèse exacte de la calciphylaxie reste inconnue. L'identification chimique et la description des calcifications cutanées par des techniques physico-chimiques pourraient contribuer à la compréhension de cette pathogenèse, conduisant à des traitements plus appropriés et à d'éventuelles mesures préventives.

La publication présentée dans ce chapitre détermine précisément la localisation, la morphologie et la composition chimique des calcifications cutanées associées à la calciphylaxie urémique en utilisant les outils précédemment cités.

Localization, Morphologic Features, and Chemical Composition of Calciphylaxis-Related Skin Deposits in Patients With Calcific Uremic Arteriopathy

Hester Colboc, MD; Philippe Moguelet, MD; Dominique Bazin, MD; Priscille Carvalho, MD; Anne-Sophie Dillies, MD; Guillaume Chaby, MD; Hervé Maillard, MD; Diane Kottler, MD; Elisa Goujon, MD; Christine Juras, MD; Marine Panaye, MD; Vincent Frochet, MD; Emmanuel Letavernier, MD, PhD; Michel Daudon, MD; Ivan Lucas, MD; Raphaël Weil, MD; Philippe Courville, MD; Jean-Benoit Monfort, MD; François Chasset, MD; Patricia Senet, MD;
for the Groupe Angio-Dermatologie of the French Society of Dermatology

IMPORTANCE Calcific uremic arteriopathy (CUA), a rare, potentially fatal, disease with calcium deposits in skin, mostly affects patients with end-stage renal disease who are receiving dialysis. Chemical composition and structure of CUA calcifications have been poorly described.

OBJECTIVES To describe the localization and morphologic features and determine the precise chemical composition of CUA-related calcium deposits in skin, and identify any mortality-associated factors.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS A retrospective, multicenter cohort study was conducted at 7 French hospitals including consecutive adults diagnosed with CUA between January 1, 2006, and January 1, 2017, confirmed according to Hayashi clinical and histologic criteria. Patients with normal renal function were excluded. For comparison, 5 skin samples from patients with arteriosclerosis and 5 others from the negative margins of skin-carcinoma resection specimens were also analyzed.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES Localization and morphologic features of the CUA-related cutaneous calcium deposits were assessed with optical microscopy and field-emission-scanning electron microscopy, and the chemical compositions of those deposits were evaluated with μ Fourier transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, and energy dispersive radiographs.

RESULTS Thirty-six patients (median [range] age, 64 [33-89] years; 26 [72%] female) were included, and 29 cutaneous biopsies were analyzed. Calcific uremic arteriopathy and arteriosclerosis skin calcifications were composed of pure calcium-phosphate apatite. Calcific uremic arteriopathy vascular calcifications were always circumferential, found in small to medium-sized vessels, with interstitial deposits in 22 (76%) of the samples. A thrombosis, most often in noncalcified capillary lumens in the superficial dermis, was seen in 5 samples from patients with CUA. Except for calcium deposits, the vessel structure of patients with CUA appeared normal, unlike thickened arteriosclerotic vessel walls. Twelve (33%) patients died of CUA.

CONCLUSIONS AND RELEVANCE Calcific uremic arteriopathy-related skin calcifications were exclusively composed of pure calcium-phosphate apatite, localized circumferentially in small to medium-sized vessels and often associated with interstitial deposits, suggesting its pathogenesis differs from that of arteriosclerosis. Although the chemical compositions of CUA and arteriosclerosis calcifications were similar, the vessels' appearances and deposit localizations differed, suggesting different pathogenetic mechanisms.

JAMA Dermatol. doi:10.1001/jamadermatol.2019.0381
Published online May 22, 2019.

[+ Editorial](#)

[+ Related article](#)

[+ Supplemental content](#)

Author Affiliations: Author affiliations are listed at the end of this article.

Group Information: The Groupe Angio-Dermatologie of the French Society of Dermatology members appear at the end of this article.

Corresponding Author: Hester Colboc, APHP, Service Plaies et Cicatrisation, Hôpital Rothschild, 5, Rue Santerre, 75012 Paris, France (hester.colboc@aphp.fr).

Uremic calciophylaxis, also called calcific uremic arteriolopathy (CUA), is a rare and severely morbid condition that predominantly affects patients with end-stage renal disease (ESRD) receiving dialysis. Its frequency among patients with ESRD reaches 4% and its incidence increases for those on hemodialysis.¹ Calcific uremic arteriolopathy's high morbidity and mortality result from extensive skin necrosis and septic complications, with the latter being the leading cause of death. For patients with ESRD, an increased risk of subsequent CUA development has been associated with female sex, diabetes mellitus, higher body mass index, elevated serum calcium, phosphorus, and parathyroid hormone levels, nutritional status, and vitamin K-antagonist treatments.²

Although noninvasive imaging tools (eg, plain radiographs) have been reported to help diagnose CUA,³ none of those tools has been systematically evaluated.⁴ Definitive CUA diagnosis requires a skin biopsy. However, because biopsy of the skin is associated with the risk of new ulceration, bleeding, and infection, actually obtaining one is sometimes debated.⁵ When obtained, deep cutaneous biopsies of CUA lesions show calcifications, smaller than 500 μm , in hypodermal vessels, interstitial tissue or both, highly suggestive of CUA with good specificity.⁶

Despite well-characterized clinical and histologic descriptions of CUA, its precise pathogenetic mechanism remains unclear.⁷ Arteriolar calcification is probably the first event, followed by thrombosis and skin ischemia. Determination of chemical composition determination and description of the skin calcifications through physicochemical techniques could contribute to understanding CUA pathogenesis, leading to more appropriate and specific treatments.⁸ Nanotechnologies are receiving increased attention to improve understanding of the effects of pathologic deposits on living tissues.^{9,10}

The aims of this study were to determine precisely the localization, morphologic features, and chemical composition of calcifications in the skin of patients with CUA, and then examine whether any association could be established between their microscopy findings and clinical characteristics.

Methods

This study followed the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) reporting guideline. This study was conducted in compliance with Good Clinical Practices and the Declaration of Helsinki,¹¹ and in accordance with French law. Formal ethics committee approval of the study protocol was obtained. Patients provided written informed consent.

Case Selection and Histopathologic Analyses

This retrospective study included consecutive adults diagnosed with CUA, confirmed according to Hayashi clinical and histologic criteria, and seen in 7 French hospitals between January 1, 2006, and January 1, 2017.¹² Patients with normal renal function were excluded. Patients' medical histories, treatments, and laboratory findings were extracted from their medi-

Key Points

Question What are the precise localization, morphologic features, and chemical composition of calciophylaxis-related skin deposits?

Findings This multicenter cohort study of 36 patients found that calcific uremic arteriolopathy calcifications are composed of pure calcium-phosphate apatite, always located circumferentially, mostly in the intima of otherwise normal-appearing vessels, and often associated with interstitial deposits, unlike calcifications observed in cutaneous arteriosclerotic vessels, which are associated with medial hypertrophy containing the calcifications and no interstitial deposits.

Meaning The differences observed between calcific uremic arteriolopathy and cutaneous arteriosclerosis regarding calcification location and morphologic vascular features suggest different pathogenetic mechanisms and provide new insights into the pathogenesis of calcific uremic arteriolopathy that could explain the poor efficacy of vasodilators and the therapeutic effect of calcium-solubilizing drugs.

cal records. They were classified into 2 clinical subgroups, distal or proximal CUA, according to the skin lesion localizations described by Brandenburg et al.¹³

Five skin samples from patients with arteriosclerosis and 5 control samples from the negative margins of skin carcinoma resections on the legs of 5 other patients were included and served as controls. All 10 control participants had normal renal function; only the 5 patients with arteriosclerosis from among a cohort of patients with necrotic angiodermatitis underwent leg-skin biopsies.

Skin biopsy samples were sent to and centralized in Tenon Hospital, Department of Pathology. For each subject, 1.5- μm -thick sections of paraffin-embedded skin biopsy specimens were deposited on glass slides, for hematoxylin-eosin-saffron and von Kossa staining, and low-e microscope slides (MirrIR, Kevley Technologies, Tienta Sciences) for field-emission-scanning electron microscopy (FE-SEM), μ Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, and Raman spectroscopy.¹⁴ Vascular and interstitial calcifications, the caliber of calcified vessels, and the topography of deposits in skin sections were analyzed and compared between patients with CUA and control participants.

Field-Emission-Scanning Electron Microscopy

Field-emission-scanning electron microscopy (Zeiss SUPRA55-VP) was used to describe the ultrastructural characteristics of tissue sections. As previously described, high-resolution images were obtained with in-lens and Everhart-Thornley secondary electron detectors.¹⁵ Measurements were taken at low voltage (1–2 kV), without the usual carbon-coating of the sample surface. For some samples, energy-dispersive radiography (EDX) was also used to identify calcium in the abnormal deposits.

μ Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopies

Using the same sample as for FE-SEM analyses, FT-IR and Raman spectroscopies identified the chemical compositions of the CUA calcifications. All the FT-IR hyperspectral images were

recorded with a Spectrum Spotlight 400 FT-IR imaging system (Perkin-Elmer Life Sciences), with 6.25-mm spatial resolution and 8-cm⁻¹ spectral resolution.¹⁶ Raman spectra were collected with a micro-Raman system (LabRam HR-800 Evolution) using 785-nm laser excitation wavelength, 100 × objective (Olympus, numerical aperture, 0.9) and 300 grooves per millimeter grating. Spectra were corrected at baseline to suppress the strong luminescence background.¹⁷

Statistical Analyses

Data are expressed as median (range) or number (%). Fisher exact or χ^2 tests were used to compare qualitative variables; Wilcoxon rank sum or Mann-Whitney tests were used to compare paired variables; and Mann-Whitney tests were used to compare nonpaired or non-normally distributed variables. Parameters with $P < .20$ in univariate analysis were entered into a multivariate logistic-regression model, with Y as the dependent variable. Two-tailed $P < .05$ was considered statistically significant. Analyses were performed with JMP version 13 (SAS Institute, Inc).

Results

Clinical and Histopathologic Findings

Among the 36 patients with CUA, median (range) age was 64 (33-89) years and 26 (72%) were female. No data on race/ethnicity were collected. Twenty-nine skin biopsies could be analyzed by optical microscopy, FE-SEM, and spectroscopies. Clinical and histopathologic data are summarized in the Table.

Optical microscopy analysis of hematoxylin-eosin-saffron- and von Kossa-stained CUA biopsy specimens always found calcifications in small and medium-sized vessels (diameter, 10-300 μ m), mostly in hypodermal arterioles and capillaries (Figure 1). These deposits occupied the entire circumference of the vessel and were located in the intima and sometimes the media. They could be associated with intimal fibrous or myxoid changes.

Those CUA vascular calcifications were associated with interstitial deposits, mainly localized to the hypodermis, in 22 (76%) of the samples. Calcification size ranged from 1 to 500 μ m, sometimes becoming confluent, with clusters reaching several millimeters in diameter. They were either isolated, small clusters between adipocytes (Figure 2A and B) or aligned in a “pearl collar” along the cytoplasmic membranes of adipocytes (Figure 2D and E). Calcified elastic fibers, collagen fibers, or both were also seen in hypodermic septa or deep dermis. Thromboses were seen in 5 samples (17%), most often in noncalcified capillaries in the superficial dermis.

The 5 arteriolosclerosis-control biopsy specimens showed classic intimal fibrous endarteritis and Mönckeberg medial calcinosis associated with calcium deposits that were localized within the media along the internal elastic lamina. Those calcifications were never circumferential and no interstitial localization was observed. Negative margins of resected carcinomas contained no vascular or interstitial calcium deposits.

Table. Baseline Clinical, Biological, and Histologic Characteristics of 36 Patients With CUA

Characteristic	No. (%)
Demographic characteristics	
Female to male ratio	2.6
Age at diagnosis, median (range), y	64 (33-89)
Comorbidities	
Dialysis	30 (83)
Dialysis-to-CUA interval, median (range), mo	24 (1-156)
Diabetes	23 (64)
Hypertension	33 (92)
BMI >30 kg/m ²	14 (39)
Vitamin K antagonists	16 (44)
Clinical characteristics	
Proximal CUA	10 (28)
Necrosis	26 (72)
Ulceration	24 (67)
Livedo reticularis	18 (50)
Indurated plaques	15 (42)
Nodular lesions	9 (25)
Biological characteristics	
Serum calcium, median (range), mmol/L	2.26 (1.89-2.84)
Serum phosphate, median (range), mmol/L	1.57 (0.93-3.68)
Calcium × phosphate product >4.5 mmol ² /L ²	12 (33)
Serum parathyroid hormone >90 ng/L	24 (67)
Serum albumin, median (range), g/L	28 (18-37)
Cutaneous histologic features	
Vascular calcifications	29 (100)
Interstitial calcifications	22 (76)
Thrombosis	5 (14)

Abbreviations: BMI, body mass index (calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared); CUA, calcific uremic arteriolopathy.

Conversion factors: To convert mmol/L to mg/dL, divide by 0.25; to convert ng/L to pg/mL, divide by 1.0; to convert g/L to g/dL, divide by 10.

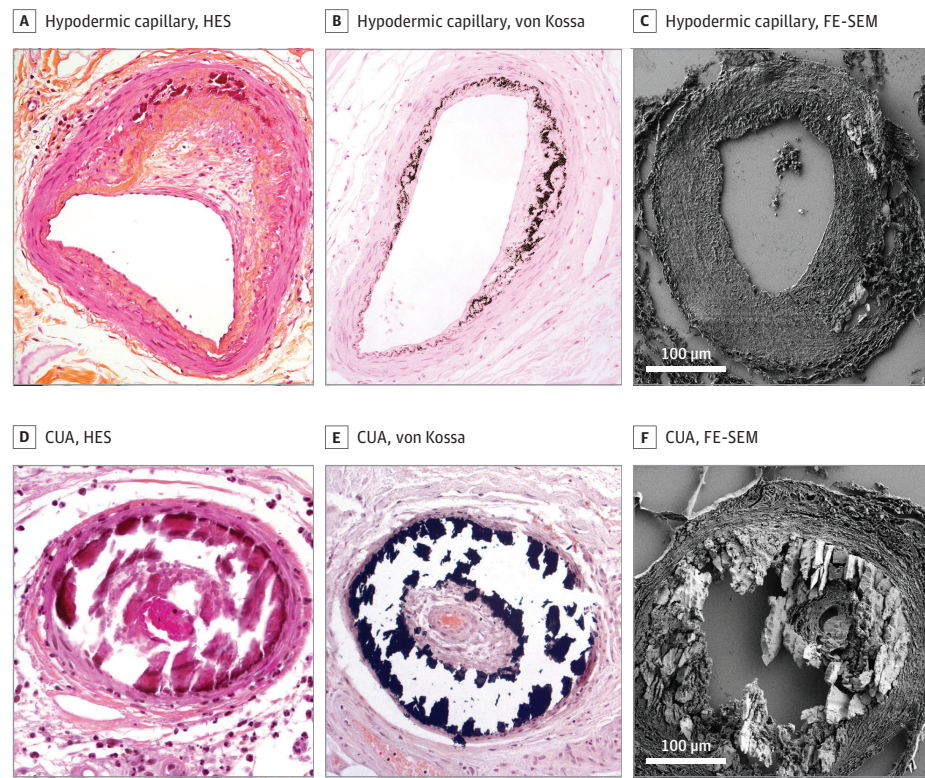
Twelve patients (33%) died of CUA. Poorer CUA prognosis was only associated with male sex (10 patients; $P = .02$) or nodular lesions (9 patients; $P = .04$) (eTable in the Supplement).

FE-SEM and Energy-Dispersive Radiograph Analyses

Subcellular calcification localization and morphologic features were assessed with FE-SEM. Vascular deposits of CUA were circumferential (Figure 1F and Figure 2C); at least 1 thrombosis in 5 of the 29 samples was located in the vessel lumen or intima, whereas the media usually appeared normal with rare calcifications. Interstitial deposits surrounded adipocytes, along the cell membranes. Morphologically, these calcifications appeared to be composed of aggregated micro-metric plates (Figure 2F).

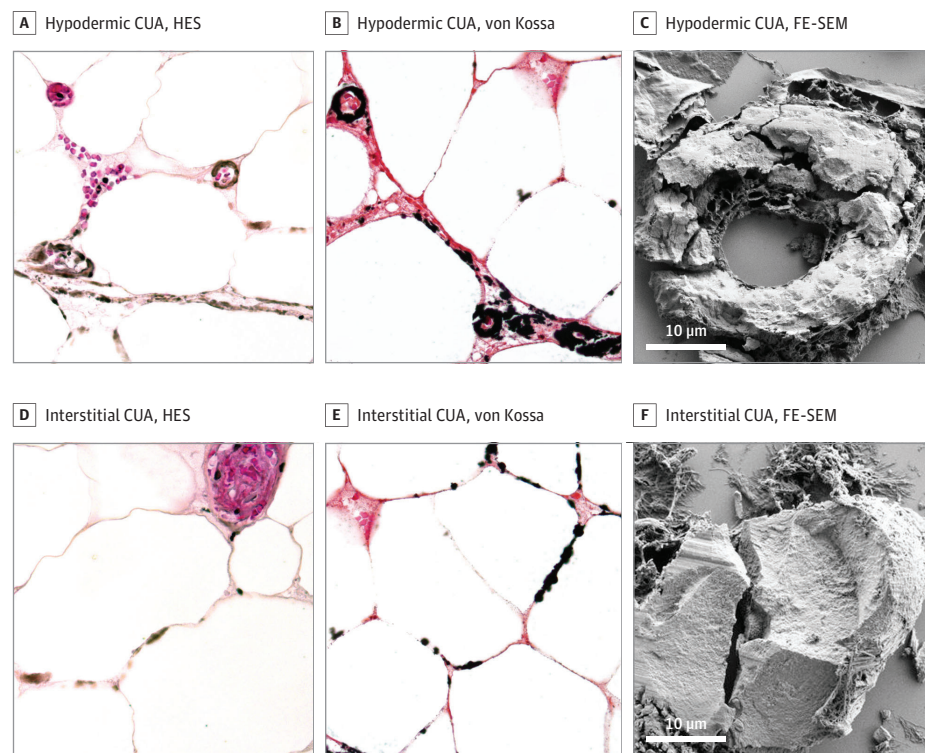
Field-emission-scanning electron microscopy analyses of control skin biopsies showing arteriolosclerosis contained vascular calcifications in the media (Figure 1C), associated with

Figure 1. Skin Biopsy Sections



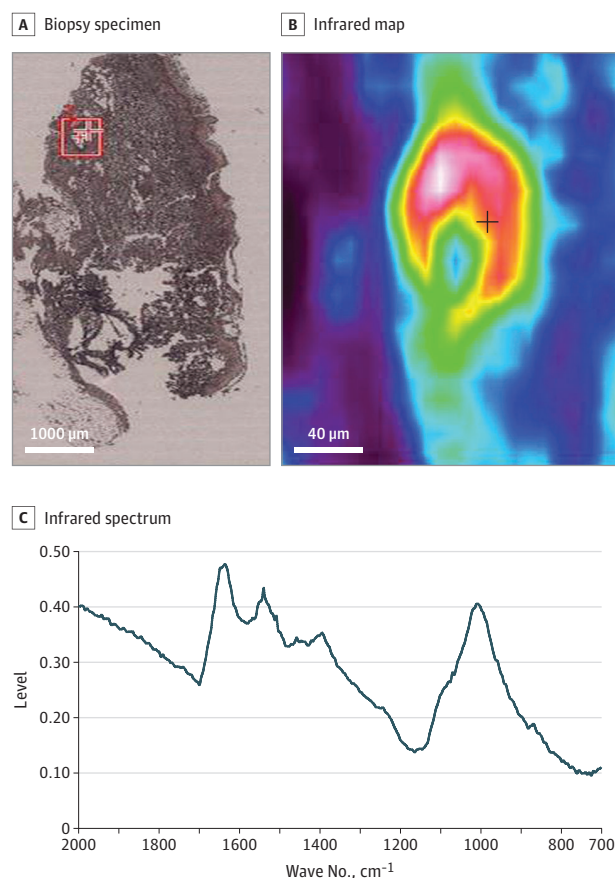
Arteriolosclerosis with asymmetrical fibrous intimal thickening (fibrous endarteritis) and Mönckeberg medial calcinosis (calcification of the internal elastic lamina and media): A, Hematoxylin-eosin-saffron (HES)-stained (original magnification $\times 400$); B, von Kossa-stained (original magnification $\times 400$); C, Field-emission-scanning electron microscopy (FE-SEM). Calcific uremic arteriolopathy (CUA) hypodermic arterioles with voluminous and circumferential parietal calcium deposits: D, HES-stained (original magnification $\times 400$); E, von Kossa-stained (original magnification $\times 400$); F, FE-SEM.

Figure 2. Skin Biopsy Sections



Calcific uremic arteriolopathy (CUA) hypodermic capillaries with voluminous and circumferential parietal calcium deposits: A, Hematoxylin-eosin-saffron (HES)-stained ($\times 400$); B, von Kossa-stained (original magnification $\times 400$); C, Field-emission-scanning electron microscopy (FE-SEM). Interstitial calcific uremic arteriolopathy (CUA) deposits, aligned along the cytoplasmic membranes of adipocytes: D, HES-stained (original magnification $\times 400$); E, von Kossa-stained (original magnification $\times 400$); F, FE-SEM.

Figure 3. μ Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy of the Interstitial Calcific Uremic Arteriopathy (CUA) Deposits



A, Skin biopsy of CUA; B, Infrared map of the red square area, showing an intense vascular deposit; C, Infrared spectrum of this vascular deposit: calcium-phosphate apatite spectrum with characteristic peaks (1009, 958 and 870 cm⁻¹) in a protein matrix (skin tissue). The same spectrum was obtained for CUA and arteriosclerosis vascular calcifications.

medial hypertrophy and intimal fibrosis; no interstitial deposits were seen. Field-emission-scanning electron microscopy analyses of negative resected carcinoma margins confirmed the absence of vascular and interstitial deposits.

Energy-dispersive radiograph analyses of CUA samples verified the calcium and phosphate composition of vascular and interstitial deposits, with similar calcium to phosphate ratios in both sites. Energy-dispersive radiograph analyses showed the composition of vascular deposits in control arteriosclerosis biopsies to be similar to that found in CUA.

Spectroscopic Analyses

μ Fourier transform infrared (FT-IR) analyses of CUA and arteriosclerosis skin calcifications showed that all were composed of calcium-phosphate apatite (Figure 3). Careful examination of 3 CUA samples identified the presence of amorphous carbonated calcium-phosphate associated with calcium-phosphate apatite that was not seen in any samples from patients with arteriosclerosis.

Raman spectroscopy confirmed the similar calcium-phosphate-apatite compositions of vascular and interstitial calcifications (Figure 4).¹⁷

Discussion

These FE-SEM, EDX, and spectroscopic analyses were able to finally specify the localization and the complete chemical composition of skin calcifications in patients with CUA. Our spectroscopic analyses demonstrated that those circumferential calcifications, located in the intima and media of skin vessels in patients with CUA, were composed exclusively of calcium-phosphate apatite. In 22 (76%) of these samples, calcium-phosphate apatite was also found in interstitial tissue of the deep dermis and hypodermis, along the cytoplasmic membranes of adipocytes, and elastic and collagen fibers.

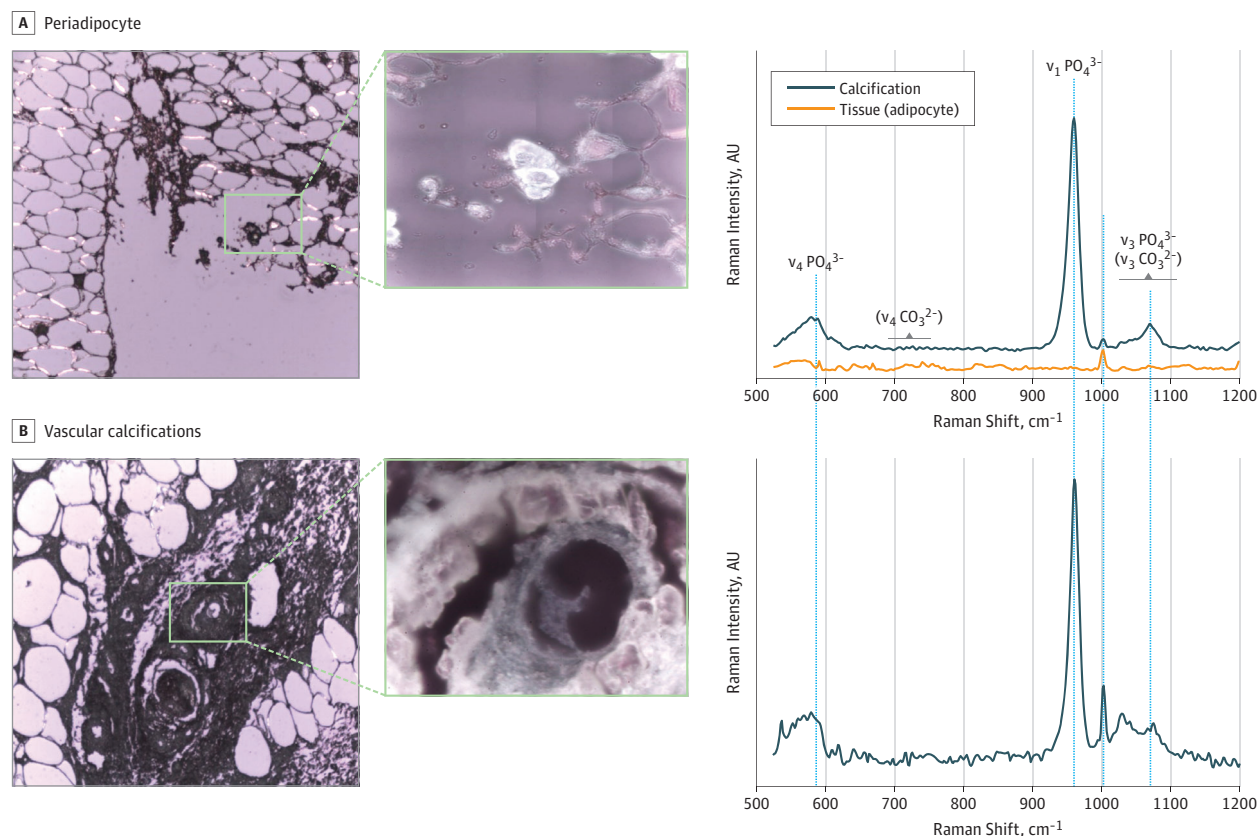
The chemical composition and localization of cutaneous CUA calcifications have been investigated in only a few small series. Using EDX and FE-SEM, Kramann et al¹⁸ found calcium/phosphate accumulations, with a molar ratio matching that of hydroxyapatite, in the hypodermis of 7 patients with CUA. Two other studies used mass spectrometry and Raman spectroscopy to detect and characterize CUA skin calcifications. Using mass spectrometry, Amuluru et al¹⁹ showed that tissue samples from 12 CUA patients had high iron and aluminum contents, suggesting a role of metal deposition in CUA pathogenesis. Using microcomputed-tomography and Raman spectroscopy, Lloyd et al²⁰ confirmed the presence carbonated apatite in debrided CUA tissues from 6 patients. However, those studies included small numbers of samples and performed only chemical analyses. To the best of our knowledge, the precise localization and exact morphologic features of these abnormal deposits have not yet been reported.

Patients with proximal lesions, body mass index greater than 30, ulcerated lesions, and female sex were reported to have poorer prognoses.²¹ Our univariate and multivariate analyses did not identify those factors as having a relationship with shorter survival, and retained only male sex and nodular lesions as being significantly associated with mortality. However, the relatively small number of patients included makes those findings less relevant than risk factors identified in larger studies.

Skin deposits in patients with CUA or arteriosclerosis were always composed of calcium-phosphate apatite, but their different localizations in the vessel walls could indicate different pathogenetic mechanisms. Indeed, arteriosclerotic vessel walls are thickened, with media hypertrophy, suggestive of slowly progressive thickening and degeneration of the arteriolar wall with secondary calcium-phosphate apatite accumulation. Circumferential CUA vascular deposits were located mostly in the intima of otherwise normal-appearing vessels, suggesting a faster and global process, with primary calcium deposition.

Ellis et al recently showed that pathognomonic cutaneous calcifications associated with CUA could also occur in viable tissue from patients with ESRD who did not have CUA, amputated because of peripheral arterial disease.^{22,23}

Figure 4. Micro-Raman Signatures and Optical Micrographs of Periadipocyte and Vascular Calcifications



Micrographs (original magnifications $\times 10$ and $\times 100$) of (A) Periadipocyte and (B) Vascular calcifications (excitation wavelength $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$; numerical aperture, 0.9). The Raman bands at 960, 1076, and 590 cm^{-1} correspond, respectively, to the v_1 , v_3 and v_4 phosphate vibrations of apatite. The

low-intensity v_4 carbonate vibrations around 680 to 715 cm^{-1} , expected for carboxyapatite, are not observed. The strong fluorescence background has been corrected on the presented spectra.

However, Ellis et al did not consider that some of their controls might have had undiagnosed acral calciophylaxis and undergone amputations for distal ischemia. Those possibilities might explain some of their histopathologic observations of calciophylaxis in their controls. Our histologic findings (circumferential calcifications of small to medium-sized vessels often associated with interstitial calcifications) and high-technology tools, such as FE-SEM, enabled us to demonstrate several differences between the vascular calcifications seen in CUA and arteriosclerosis, thereby confirming our previous results and those of Chen et al.^{6,24}

Patients with calciophylaxis probably develop skin calcifications subsequent to a disequilibrium between calcification promoters and inhibitors. Calcium-inhibitor deficiency, such as matrix Gla protein, impaired inhibition of calcium-phosphate precipitation, thereby leading to skin calcifications.²¹

Chronic inflammatory states, including ESRD, are associated with increased levels of reactive oxygen species that impair endothelial function.²⁵ ESRD-related endothelial dysfunction engenders vessel-wall abnormalities, including the presence of bone morphogenetic protein in medial and intimal layers.²⁶ Such vascular protein modification, associ-

ated with increased calcium $\times$ phosphate products, might explain the intimal and medial calcifications observed in CUA.

Interstitial calcifications were also seen in 22 (76%) of CUA samples. Voluminous calcifications of the subcutaneous tissue or dystrophic and metastatic calcinosis cutis are known to occur in a variety of disorders, including dermatomyositis, lupus, or trauma. The ectopic calcified masses, composed of hydroxyapatite and amorphous calcium-phosphate apatite, were disseminated throughout the dermis and hypodermis that appeared petrified, involving interstitial tissue and vessels.²⁷ The pathophysiologic development is still unclear but it has been hypothesized that hypodermal inflammation might release the phosphate bound to denatured proteins and serve as a niche for ectopic calcifications.²⁷ However, despite clinical and pathologic differences, the physiology of these calcifying disorders might be similar, and calcium deposits obstructing some hypodermis vessels in CUA might lead to detrimental adipocyte, collagen and elastic fiber alterations, and the release of the phosphate bound to denatured proteins and ectopic interstitial calcifications. According to that hypothesis, interstitial calcifications might be a secondary phenomenon, thereby explaining the inconstant interstitial localization. The constant pres-

ence of vascular deposits could suggest a primary vascular trigger of CUA.

Our finding that CUA vascular calcifications were always circumferential suggests that therapeutic strategies with vasodilators might be less relevant than those using calcium-solubilizing drugs. Therefore, drugs that act on calcium-phosphate precipitation, such as sodium thiosulfate, bisphosphonates, and vitamin K supplements, would seem to be more appropriate and a rational approach for future therapeutic studies on CUA.^{27,28} Along the same line, Dedinszki et al,²⁹ who studied other calcifying disorders, including pseudoxanthoma elasticum and generalized arterial calcifications of infancy, reported that oral pyrophosphate inhibited tissue calcifications.³⁰

Limitations

Because our study was retrospective, some information, including vital status, was missing for some patients. Our failure to identify factors associated with greater mortality in larger studies might be explained by the relatively small size of our

series. It is worth highlighting that morphologic features of calcification can be modified by sectioning paraffin-embedded skin biopsy specimens and that the appearance of these deposits may differ between glass and low-e slides, making it more difficult to discern the association between optical microscopy and electronic microscopy.

Conclusions

Our histologic, FE-SEM, EDX, and spectroscopy results provide a better understanding of the morphologic, ultrastructural, and chemical characteristics of skin calcium-phosphate-apatite deposits in patients with CUA. Those deposits appear to be initially vascular and develop rapidly in normal vessel walls. Circumferential vascular and interstitial deposits, albeit inconstant, were specific to CUA. Although the chemical compositions of the calcifications were similar in CUA and arteriosclerosis, the vessels' appearances and deposit localizations differed, suggesting different pathogenetic mechanisms.

ARTICLE INFORMATION

Accepted for Publication: February 15, 2019.

Published Online: May 22, 2019.

doi:10.1001/jamadermatol.2019.0381

Author Affiliations: Service Plaies et Cicatrisation, Sorbonne Université, Hôpital Rothschild, Paris, France (Colboc); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche (UMR) S 1155, Paris, France (Colboc, Letavernier); Anatomie et Cytologie Pathologiques, Sorbonne Université, Hôpital Tenon, Paris, France (Moguellet); Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Laboratoire de Chimie Physique, Ba340, Université Paris XI, Orsay, France (Bazin); Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, Rouen, France (Carvalho); Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens, Amiens, France (Dillies, Chaby); Service de Dermatologie, Centre Hospitalier du Mans, Le Mans, France (Maillard); Service de Dermatologie, Hôpital Bichat, Paris, France (Kottler); Service de Dermatologie, Centre Hospitalier de Chalon-sur-Saône, Chalon-sur-Saône, France (Goujon); Service de Médecine Vasculaire, Clinique du Tonkin, Villeurbanne, France (Jurus, Panaye); Service des Explorations Fonctionnelles Multidisciplinaires, Sorbonne Université, Hôpital Tenon, Paris, France (Frochot, Daudon); Sorbonne Université, Hôpital Tenon, Service des Explorations Fonctionnelles Multidisciplinaires, Paris (Letavernier); Sorbonne Universités, Unité Mixte de Recherche (UMR) 8235, Paris, France (Lucas); Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Laboratoire de Physique des Solides, Ba510, Université Paris XI, Orsay, France (Weil); Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, Anatomie et Cytologie Pathologiques, Rouen, France (Courville); Service de Dermatologie, Sorbonne Université, Hôpital Tenon, Paris, France (Monfort, Chasset, Senet).

Author Contributions: Dr Colboc had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Drs Moguellet and Bazin are co-second authors.

Concept and design: Colboc, Moguellet, Bazin, Frochot, Letavernier, Senet.

Acquisition, analysis, or interpretation of data: All authors.

Drafting of the manuscript: Colboc, Bazin, Dillies, Frochot, Senet.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Colboc, Moguellet, Bazin, Carvalho, Chaby, Maillard, Diane, Goujon, Jurus, Panaye, Frochot, Letavernier, Daudon, Lucas, Weil, Courville, Monfort, Chasset, Senet.

Statistical analysis: Chasset.

Obtained funding: Bazin, Dillies, Chaby, Frochot, Courville.

Administrative, technical, or material support: Colboc, Moguellet, Bazin, Carvalho, Maillard, Jurus, Frochot, Weil, Monfort, Senet.

Supervision: Colboc, Moguellet, Bazin, Frochot, Letavernier, Daudon, Lucas, Monfort, Senet.

Conflict of Interest Disclosures: Dr. Senet reported receiving personal fees from URGO, personal fees from SERVIER, and personal fees from SIGVARIS outside the submitted work. No other disclosures were reported.

Group Information: The Groupe Angio-Dermatologie of the French Society of Dermatology members are Stéphane Barete, MD (Service de Dermatologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris); Nathalie Baudot, MD (Service de Dermatologie, Hôpital Tenon, Paris, France); Nathalie Beneton, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalier du Mans, Le Mans, France); Maud Bezier, MD (Service de Dermatologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France); Paul Bilan, MD (Service de Dermatologie, Hôpital Robert Ballanger, Aulnay-sous-Bois, France); Sophie Blaise, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Grenoble, France); Thierry Boye, MD (Service de Dermatologie, Hôpital d'Instruction des Armées, Toulon, France); Priscille Carvalho, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Rouen, France); Michel Colomb, MD (Service de Dermatologie, Polyclinique Reims, Bezaune, France); Patrick Combemale, MD (Service de Dermatologie, Centre Léon Berard,

Lyon, France); Jean-François Cuny, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Régional, Metz, France); Olivier Dereure, MD, PhD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Montpellier, France); Anne-Sophie Dillies, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Amiens, France); Anne Dopmartin, MD, PhD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Caen, France); Brigitte Faivre, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Besançon, France); Juliette Fontaine, MD (Service Plaies et Cicatrisation, Hôpital Rothschild, Paris, France); Camille Frances, MD, PhD (Service de Dermatologie, Hôpital Tenon, Paris, France); Elisa Goujon, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalier, Chalon-sur-Saône, France); Bernard Guillot, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Montpellier, France); Romain Jacquet, MD (Médecine Vasculaire, Private Practice, Reims, France); Julie Journet, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalier, Chalon-sur-Saône, France); Diane Kottler, MD (Service de Dermatologie, Hôpital Bichat, Paris, France); Isabelle Lazareth, MD (Service de Médecine Vasculaire, Hôpital Saint-Joseph, Paris, France); Marie-Thérèse Leccia, MD, PhD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Grenoble, France); Véronique LeCerf, MD (Dermatologie, Private Practice, Paris, France); Anne-Laure Liegon, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalier, Valence, France); Catherine Lok, MD, PhD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Amiens, France); Emmanuel Mahe, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Régional, Argenteuil, France); Hervé Maillard, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalier du Mans, Le Mans, France); Jacques Martel, MD (Dermatologie, Private practice, Cenon, France); Sylvie Meaume, MD (Service Plaies et Cicatrisation, Hôpital Rothschild, Paris, France); Philippe Modiano, MD, PhD (Service de Dermatologie, Hôpital Saint Vincent de Paul, Lille, France); Jean-Benoît Monfort, MD (Service de Dermatologie, Hôpital Tenon, Paris, France); Christine Moulinier, MD (Service de Dermatologie,

Centre Hospitalo-Universitaire, Amiens, France); Géraldine Perceau, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Reims, France); Bruno Sassolas, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Brest, France); Amélie Schoeffler, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Régional, Metz, France); Magali Segard, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Lille, France); Jean-Luc Schmutz, MD, PhD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Nancy, France); Patricia Senet, MD (Service de Dermatologie, Hôpital Tenon, Paris, France); Emilie Tella, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Régional, Argenteuil, France); Pascal Toussaint, MD (Service de Dermatologie, Maison de Santé Protestante de Bordeaux-Bagatelle, Talence, France); François Truchetet, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Régional, Metz, France); Loïc Vaillant, MD, PhD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Tours, France); and Béatrice Villemur, MD (Service de Dermatologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Grenoble, France).

Additional Contributions: We thank LabEx MICHEM (ANR-11-IDEX-0004-02) for allowing us to use their nano/micro-Raman facilities in UPMC. We thank Quentin Rezard, MS, from CNRS, LPC, Ba340, Université Paris XI, and Chantal Jouanneau, MS, from INSERM, Hôpital Tenon, for their help and support in this study. They were not compensated for their contributions.

REFERENCES

- Weenig RH, Sewell LD, Davis MD, McCarthy JT, Pittelkow MR. Calciophylaxis: natural history, risk factor analysis, and outcome. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56(4):569-579. doi:10.1016/j.jaad.2006.08.065
- Nigwekar SU, Zhao S, Wenger J, et al. A nationally representative study of calcific uremic arteriopathy risk factors. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27(11):3421-3429. doi:10.1681/ASN.2015091065
- Shmidt E, Murthy NS, Knudsen JM, et al. Net-like pattern of calcification on plain soft-tissue radiographs in patients with calciophylaxis. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(6):1296-1301. doi:10.1016/j.jaad.2012.05.037
- Halasz CL, Munger DP, Frimmer H, Dicorato M, Wainwright S. Calciophylaxis: comparison of radiologic imaging and histopathology. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(2):241-246.e3. doi:10.1016/j.jaad.2017.01.040
- Nigwekar SU, Kroshinsky D, Nazarian RM, et al. Calciophylaxis: risk factors, diagnosis, and treatment. *Am J Kidney Dis*. 2015;66(1):133-146. doi:10.1053/j.ajkd.2015.01.034
- Cassius C, Moguelet P, Monfort JB, et al. Calciophylaxis in haemodialysed patients: diagnostic value of calcifications in cutaneous biopsy. *Br J Dermatol*. 2018;178(1):292-293. doi:10.1111/bjd.15655
- Jean G, Terrat JC, Vanel T, et al. Calciophylaxis in dialysis patients: to recognize and treat it as soon as possible [in French]. *Nephrol Ther*. 2010;6(6):499-504. doi:10.1016/j.nephro.2010.04.003
- Bazin D, Daudon M, Combes C, Rey C. Characterization and some physicochemical aspects of pathological microcalcifications. *Chem Rev*. 2012;112(10):5092-5120. doi:10.1021/cr200068d
- Colboc H, Moguelet P, Bazin D, et al. Physicochemical characterization of inorganic deposits associated with granulomas in cutaneous sarcoidosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(1):198-203. doi:10.1111/jdv.15167
- Bazin D, Daudon M. Pathological calcifications and selected examples at the medicine-solid-state physics interface. *J Phys Appl Phys*. 2012;45(38):383001. doi:10.1088/0022-3727/45/38/383001
- World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-2194. doi:10.1001/jama.2013.281053
- Hayashi M. Calciophylaxis: diagnosis and clinical features. *Clin Exp Nephrol*. 2013;17(4):498-503. doi:10.1007/s10157-013-0782-z
- Brandenburg VM, Cozzolino M, Ketteler M. Calciophylaxis: a still unmet challenge. *J Nephrol*. 2011;24(2):142-148. doi:10.5301/JN.2011.6366
- 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(11):e28007. doi:10.1371/journal.pone.0028007
- Brisset F. *Microscopie Électronique à Balayage et Microanalyses*. Paris, France: EDP Sciences; 2012.
- Carden A, Morris MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *J Biomed Opt*. 2000;5(3):259-268. doi:10.1117/1.429994
- Awonusi A, Morris MD, Tecklenburg MM. Carbonate assignment and calibration in the Raman spectrum of apatite. *Calcif Tissue Int*. 2007;81(1):46-52. doi:10.1007/s00223-007-9034-0
- Kramann R, Brandenburg VM, Schurgers LJ, et al. Novel insights into osteogenesis and matrix remodelling associated with calcific uraemic arteriopathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(4):856-868. doi:10.1093/ndt/gfs466
- Amuluru L, High W, Hiatt KM, et al. Metal deposition in calcific uremic arteriopathy. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61(1):73-79. doi:10.1016/j.jaad.2009.01.042
- Lloyd WR, Agarwal S, Nigwekar SU, et al. Raman spectroscopy for label-free identification of calciophylaxis. *J Biomed Opt*. 2015;20(8):80501. doi:10.1117/1.JBO.20.8.080501
- Nigwekar SU, Thadhani R, Brandenburg VM. Calciophylaxis. *N Engl J Med*. 2018;378(18):1704-1714. doi:10.1056/NEJMra1505292
- Ellis CL, O'Neill WC. Questionable specificity of histologic findings in calcific uremic arteriopathy. *Kidney Int*. 2018;94(2):390-395. doi:10.1016/j.kint.2018.03.016
- Nigwekar SU, Nazarian RM. Cutaneous calcification in patients with kidney disease is not always calciophylaxis. *Kidney Int*. 2018;94(2):244-246. doi:10.1016/j.kint.2018.04.019
- Chen TY, Lehman JS, Gibson LE, Lohse CM, El-Azhary RA. Histopathology of calciophylaxis: cohort study with clinical correlations. *Am J Dermatopathol*. 2017;39(11):795-802. doi:10.1097/DAD.0000000000000824
- Sowers KM, Hayden MR. Calcific uremic arteriopathy: pathophysiology, reactive oxygen species and therapeutic approaches. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3(2):109-121. doi:10.4161/oxim.3.2.11354
- Nigwekar SU, Jiramongkolchai P, Wunderer F, et al. Increased bone morphogenetic protein signaling in the cutaneous vasculature of patients with calciophylaxis. *Am J Nephrol*. 2017;46(5):429-438. doi:10.1159/000484418
- Reiter N, El-Shabrawi L, Leinweber B, Berghold A, Aberer E. Calcinosis cutis: part I: diagnostic pathway. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(1):1-12. doi:10.1016/j.jaad.2010.08.038
- Zitt E, König M, Vychytil A, et al. Use of sodium thiosulphate in a multi-interventional setting for the treatment of calciophylaxis in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(5):1232-1240. doi:10.1093/ndt/gfs548
- Dedinszki D, Szeri F, Kozák E, et al. Oral administration of pyrophosphate inhibits connective tissue calcification. *EMBO Mol Med*. 2017;9(11):1463-1470. doi:10.15252/emmm.201707532
- Nigwekar SU, Bloch DB, Nazarian RM, et al. Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla protein influences the risk of calciophylaxis. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(6):1717-1722. doi:10.1681/ASN.2016060651

2) Ulcères de jambe calcifiés du sujet âgé: description clinique et caractérisation structurale et chimique (*article publié dans le Journal of Gerontology*)

Des calcifications dystrophiques peuvent également être trouvées au sein de plaies chroniques, telles que les ulcères.

Bien que leur présence soit rapportée depuis plusieurs décennies, ces calcifications associées aux ulcères de jambes ont été très peu étudiées et leur mécanisme de formation est mal compris. Dans la littérature, elles sont le plus souvent associées à l'insuffisance veineuse et à l'origine de retards de cicatrisation. Il n'existe actuellement aucun traitement standard pour leur prise en charge, et le plus souvent celle-ci consiste en l'ablation à la pince des calcifications émergentes dans le lit de la plaie au cours de la réfection du pansement.

La publication suivante présente les résultats d'une analyse ultra structurale et chimique rigoureuse de ces calcifications, corrélée à la présentation clinique et biologique de ces patients.

Original Article

Calcified Leg Ulcers in Older Patients: Clinical Description, Morphology, and Chemical Characterization

Hester Colboc, MD,^{1,*} Juliette Fontaine, MD,¹ Dominique Bazin, PhD,² Vincent Frochot, PhD,^{3,4} Emmanuel Letavernier, PhD,^{3,4} Michel Daudon, PhD,^{3,4} Naomi Laporte,¹ Stéphan Rouzière, PhD,⁵ Michael Reby, MD,¹ Agnes Galezowski, MD,¹ Christine Forasassi, MD,¹ and Sylvie Meaume, MD¹

¹Sorbonne Université, Hôpital Rothschild, Service Plaies et Cicatrisation, Paris, France. ²CNRS, IPC, Ba340, Université Paris XI, Orsay, France. ³Sorbonne Université, Hôpital Tenon, Service des Explorations Fonctionnelles Multidisciplinaires, Paris, France. ⁴UMR_S 1155, Sorbonne Université-UPMC Paris 06, France. ⁵Laboratoire de Physique des Solides, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay, France.

*Address correspondence to: Hester Colboc, MD, APHP, Service Plaies et Cicatrisation, Hôpital Rothschild, 5, Rue Santerre, 75012 Paris, France. E-mail: hestercolboc@gmail.fr

Received: December 22, 2020; Editorial Decision Date: July 27, 2021

Decision Editor: David Le Couteur, MBBS, FRACP, PhD

Abstract

Chronic wounds, including leg ulcers, constitute an important medical problem among older patients. Dystrophic calcifications (DC) are associated with a variety of disorders, including leg ulcers. The aim of this study was to report the clinical and biological characteristics of older patients with DC in leg ulcers and to determine the morphology and chemical composition of these calcifications. We conducted a prospective monocentric study in our Geriatric-Wound and Healing ward, Rothschild Hospital, Paris, from January 2018 to December 2019. Patients with leg ulcers were screened for DC by palpation. Patients' clinical, biological, and radiological findings were collected. DC morphology was analyzed using field-emission scanning electron microscopy and chemical composition was analyzed using μ Fourier transform infra-red spectroscopy and X-ray Fluorescence. Ten (7%) of the 143 patients hospitalized for leg ulcers presented DC. Older patients with DC were more likely to have leg ulcers with venous insufficiency ($p = .015$), colonized by *Pseudomonas aeruginosa* ($p = .026$), with a longer healing evolution ($p = .0072$) and hypercalcemia ($p = .041$). Five DC were extracted from ulcers: 2 presented 500 nm lacunar spheres and intermingled fibrils of about 10 nm in diameter, consistent with bacterial and biofilm imprints. DC were always composed of calcium-phosphate apatite and associated to the presence of zinc. Our analyses were consistent with the involvement of microorganisms and inflammatory process in DC formation. Early management of venous insufficiency, treatment of chronic bacterial colonization and use of calcium-solubilizing drugs seem to be rational strategies for calcified leg ulcer management in older patients.

Keywords: Dystrophic calcification, μ Fourier Transform Infra-Red spectroscopy, Field emission scanning electron microscopy, X-ray Fluorescence

Chronic wounds constitute an important, but understudied medical problem among older patients. These wounds are often classified as leg ulcers, pressure ulcers, and diabetic neuropathic foot ulcers. In the United States, chronic wounds affect 6.5 million patients (1). Regarding health costs, chronic wounds account in France for at least 1 billion € per year (2). They result in diminished quality of life, frequent hospitalizations, and increased morbidity and mortality.

Dystrophic calcifications are associated with a variety of disorders, such as vascular diseases, connective tissue diseases, inherited disorders, cutaneous neoplasms, and infections (3). It is commonly

admitted that aging is a risk factor for developing vascular, cardiac valve, and soft tissue dystrophic calcifications, although the exact pathogenesis link between these calcifications and aging remains unknown (4).

Dystrophic calcifications (DC) can also be found within non-healing wounds such as leg ulcers (5). Few studies have been published on the subject, in which DC are usually detected by palpation, routine x-rays, or ultrasonography. They showed that DC affect up to 10% of patients with chronic venous insufficiency, affect more often older women, are associated with longer

disease duration and more severe clinical scores, and are often resistant to compression therapy (6–8). Dystrophic calcification in a wound creates chronic foreign body inflammatory reaction that contributes to a non-healing ulcer if calcific deposits are not removed (9). To treat DC, calcium-channel blockers, minocycline, bisphosphates, topical sodium thiosulfate, and surgical debridement have been reported with limited results (10). There is currently no standard treatment for dystrophic subcutaneous calcifications in ulcers.

In order to prevent calcified deposits from developing in patients' ulcers, better understanding of their pathophysiology is necessary. However, up to now, very few studies have looked into DC pathogenesis and ways to prevent their occurrence.

The aim of this study was to report clinical and biological characteristics of older patients with DC in leg ulcers and to determine precisely the morphology and chemical composition of these calcifications.

Method

Participants

A prospective monocentric study was conducted in our Geriatric Wound and Healing ward, at Rothschild Hospital in Paris, from January 2018 to December 2019. All the patients hospitalized in our ward for leg ulcers were screened for DC within the wound by palpation. Patients' medical history, treatments, laboratory, and radiological findings were extracted from their medical charts. Regarding clinical and biological variables, the following definitions were used: lower limb arteriopathy was defined by an ankle-brachial index inferior to 0.90; malnutrition was defined by a body mass index inferior to 21 kg/m² and/or serum albumin inferior to 35 g/L; chronic kidney disease was defined by an estimated glomerular filtration rate (using the MDRD equation) inferior to 60 mL/min; hypercalcemia was defined by a corrected serum calcium superior to 2.6 mmol/L. All patients were clinically screened for *Pseudomonas aeruginosa* colonization; such diagnosis was based on the presence of the following evocative signs: malodorous and greenish wound or greenish tinge on removed dressings.

All participants gave their oral consent for DC analysis. This study was performed in compliance with Good Clinical Practices and the Declaration of Helsinki, and in accordance with French law. DC were collected and analyzed in routine practice, as performed for kidney stones and other ectopic calcifications (CNIL Declaration Number 1709404).

Morphological and Chemical Characterizations

As part of the standard dressing refection, wounds are debrided using a scalpel or a curette. If the DC were extracted during this procedure, they were then analyzed using three different physicochemical techniques: μ Fourier Transform Infra-Red (FT-IR) spectroscopy, Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM), and X-ray Fluorescence (XRF). This combination of methods has been demonstrated to be particularly effective for physicochemical identification of mineral deposits in various tissue samples (11).

FE-SEM

FE-SEM (Zeiss SUPRA55-VP, Oberkochen, Germany) was used to describe the ultrastructural characteristics of DC. As previously described, high-resolution images were obtained by two secondary electron detectors: an in-lens SE detector and an Everhart Thornley

SE detector (12). Measurements were taken at low voltage (1–2 kV) without the usual carbon coating of the sample surface. DC were imaged at similar magnification for comparison.

FT-IR Spectroscopy

Using the same sample as those used for FE-SEM analyses, FT-IR spectroscopy identified the chemical compositions of the DC. All the FT-IR hyperspectral images were recorded with a Spectrum Spotlight 400 FT-IR imaging system (Perkin–Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France), with 6.25-mm spatial resolution and 8 cm⁻¹ spectral resolution (13). The compounds were identified by comparing them to reference spectra (14).

XRF

XRF experiments were performed directly on DCs, in order to identify and quantify the presence of heavy metals. XRF was performed using Molybdenum rotating anode x-ray generator (Rigaku RU200) coupled with multilayer W/Si optics (Xenocs) delivering a focalized and monochromated ($\lambda = 0.711 \text{ \AA}$) x-ray beam of 150 $\mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$ size (15). Fluorescence spectra were measured with an energy-dispersive detector (SDD detector, Ketek), with a time acquisition of 30 minutes. XRF analysis was performed with PyMca software (16).

Statistical Analyses

Values are expressed as n (%) or median (interquartile range). Chi-2 test with Yates' correction was used to compare qualitative variables; Mann–Whitney test was used to compare quantitative variables.

Results

Clinical, Biological, and Radiological Findings

One hundred forty-three patients were treated for leg ulcers in the ward from January 2018 to December 2019. Ten (7%) of these patients presented DC in leg ulcers. Demographic, geriatric assessment, comorbidities, clinical, and biological characteristics are summarized in Table 1. Patients with and without DC had comparable demographic data, geriatric assessment, and comorbidities.

All of the patients with DC had either a venous (4 patients) or a mixed arteriovenous (6 patients) leg ulcer. Patients with DC were statistically more likely to have leg ulcers with venous insufficiency ($p = .015$), colonized by *P. aeruginosa* ($p = .026$) and a longer healing evolution ($p = .0072$).

Most of the patients with DC were treated with either silver sulfadiazine dressing to treat *P. aeruginosa* colonization or silver nitrate solution to treat hypergranulation tissue during their hospitalization. Clinically visible DC were always removed, which helped diminish the size of the leg ulcer. However, since for most patients visible removable DC was associated to other deeper DC located in other areas, full healing of all the wounds could not be achieved.

From a biological point of view, patients with DC had statistically higher levels of serum calcium ($p = .048$) and were statistically more likely to have hypercalcemia ($p = .041$).

When performed, leg x-rays found constant subcutaneous calcifications, associated with vascular calcifications in 4 cases (Figure 1A). Both leg arteries (peroneal, anterior tibial, and posterior tibial) and veins (greater saphenous vein) were calcified. When DC could be extracted from the wound, the calcifications had a yellowish-brownish color, with an irregular surface, measuring from 0.5 to 1 centimeter (Figure 1B).

Table 1. Baseline Clinical, Biological, and Radiological Characteristics of the Patients

Characteristic	Calcified Leg Ulcer (<i>n</i> = 10)	Noncalcified Leg Ulcer (<i>n</i> = 133)	<i>p</i> Value
Demographic			
Female/male ratio	9	3.4	.58
Age at diagnosis, years	89 [81–94]	86 [81–89]	.38
Geriatric assessment and comorbidities			
Geriatric Index of Comorbidity	2.5 [2–3]	2 [2–3]	.69
Activities of daily living	4 [2–5.5]	5 [2–5.5]	.93
Cognitive Impairments	3 (30%)	37 (28%)	.67
Malnutrition	6 (60%)	105 (79%)	.27
Hypertension	8 (80%)	96 (72%)	.92
Lower limb arteriopathy	6 (60%)	77 (59%)	.75
Chronic kidney disease	1 (10%)	58 (44%)	.080
Body mass index > 30 kg/m ²	2 (20%)	23 (17%)	.83
Diabetes	1 (10%)	36 (27%)	.40
Clinical			
Ulcer duration (years)	2 [0.9–9.5]	0.5 [0.2–2.0]	.0072
Venous insufficiency	10 (100%)	73 (55%)	.015
Past history of venous thromboembolism	2 (20%)	22 (16%)	.87
Incompressible ankle arteries	4 (40%)	33 (25%)	.51
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> colonization	8 (80%)	57 (43%)	.026
Recurrent erysipelas	8 (80%)	65 (49%)	.13
Biological			
Serum calcium, mmol/L	2.35 [2.28–2.37]	2.26 [2.20–2.34]	.048
Corrected serum calcium, mmol/L	2.54 [2.47–2.68]	2.49 [2.42–2.57]	.17
Hypercalcemia*	3 (30%)	13 (10%)	.041
Serum phosphate, mmol/L	1.13 [0.98–1.19]	1.04 [0.93–1.11]	.26
Serum 25-hydroxyvitamin D, nmol/L	33 [11–84]	49 [25–77]	.56
Serum albumin, g/L	30 [28–35]	31 [28–35]	.88
Radiological			
Subcutaneous calcifications	6 (100%)	NA	-
Vascular calcifications	4 (67%)	NA	-

Notes: Values are expressed as *n* (%) or median [interquartile range]. NA = not available.

*Hypercalcemia is defined by a corrected serum calcium > 2.6 mmol/L.

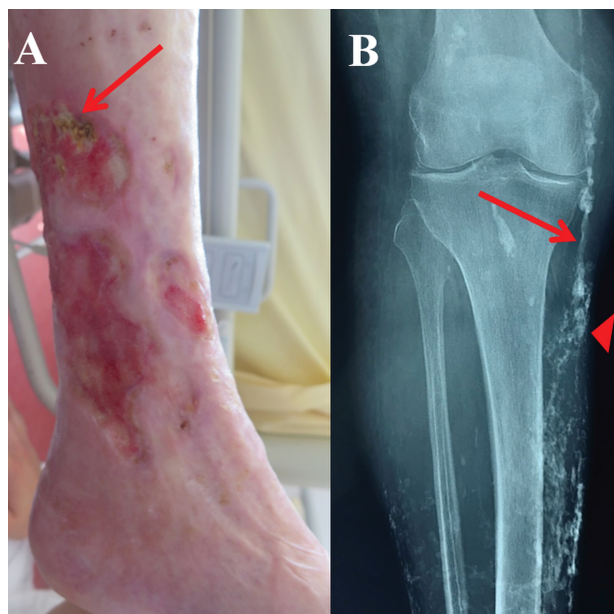


Figure 1. Clinical and radiological features of a dystrophic calcification. (A) Typical clinical presentation, with yellowish-brownish hard deposits, adherent to the base of the wound (arrow). (B) Typical leg x-ray observed in DC within leg ulcer, with vascular calcifications of the greater saphenous vein (linear structure, arrow) and subcutaneous calcifications (arrow-head).

Morphological and Chemical Characterization

Five DC were extracted from leg ulcers during wound debridement and underwent physicochemical analysis.

FE-SEM

FE-SEM observation showed lacunar spheres (500 nm in size) on the calcifications' surface of 2 of the 5 DC analyzed, compatible with bacterial imprints (Figure 2) (17,18). Two patients had colonization to *P. aeruginosa* and had erysipelas. In one case, these imprints were surrounded by intermingled fibrils of about 10 nm in diameter, compatible with exopolymeric matrix material, a biopolymer on which is embedded biofilm microorganisms (19,20). In some areas of the calcifications, spherical entities of 100–300 nm were also identified.

FT-IR Spectroscopy

FT-IR analysis showed that all DC were made of apatite associated with amorphous carbonated calcium phosphate and proteins (Figure 3).

XRF

A typical x-ray fluorescence spectrum of a biological sample is shown in Figure 4 where we observe the contributions of different elements. In all 5 DC, contributions coming from calcium (Ca) and phosphorus (P) are identified as well as two heavy metals: zinc and strontium (21). Presence of strontium is due to the fact that calcium

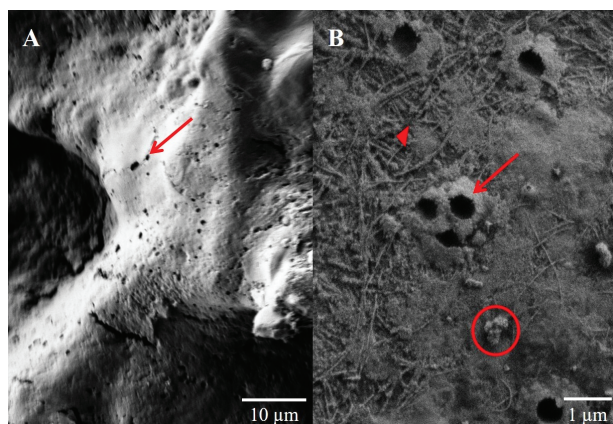


Figure 2. Field emission scanning electron microscopy. (A) Isolated lacunar spheres (500 nm in size) within the calcification surface (arrow). (B) Lacunar spheres (around 500 nm in size, arrow) surrounded by intermingled fibrils of about 10 nm in diameter (arrow-head), compatible with exopolymeric matrix material, a biopolymer on which is embedded biofilm microorganisms. Spherical entities of 100–300 nm can also be identified (circle).

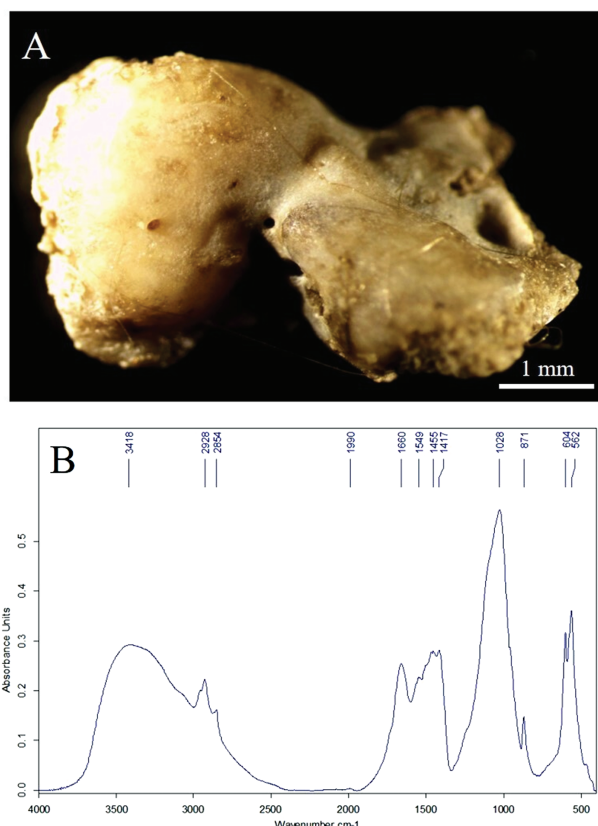


Figure 3. Macroscopic aspect and μ Fourier transform infra-red spectroscopy of a dystrophic calcification. (A) Macroscopic aspect of a dystrophic calcification extracted from a leg ulcers. (B) Infra-red spectrum: calcium-phosphate apatite spectrum with characteristic peaks (1015, 959, and 875 cm^{-1}) associated with amorphous carbonated Calcium-phosphate.

and strontium have similar chemistry (these two elements share the same column in the periodic table), and commonly substitute for one another in minerals (22).

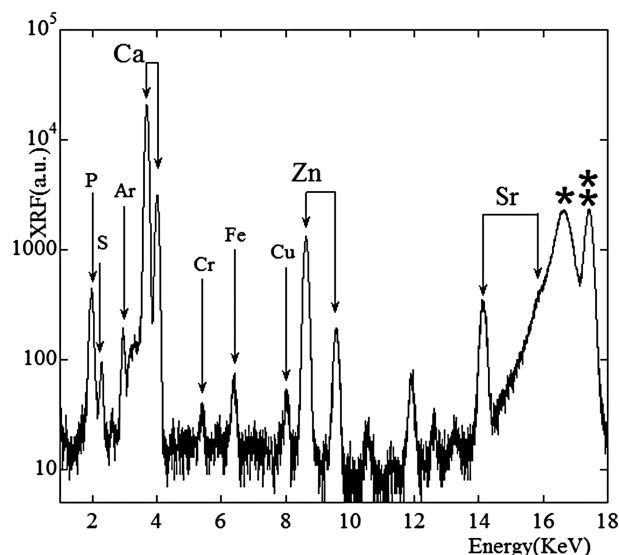


Figure 4. X-ray fluorescence spectrum collected from a dystrophic calcification. We can see clearly the contributions of calcium ($K\alpha = 3691$ eV, $K\beta = 4012$ eV), phosphore ($K\alpha = 2000$ eV), zinc ($K\alpha = 8638$ eV, $K\beta = 9572$ eV), and strontium ($K\alpha = 14165$ eV). Chromium (Cr), iron (Fe), and copper (Cu) are contaminating elements coming from the stainless steel collimator used for detection. Presence of silver (Ar) and sulfure (S) is probably the consequence of the use of silver sulfate dressing to treat colonized wound. * corresponds to compton peak, ** corresponds to Rayleigh peak, respectively inelastic and elastic scatter that always occur within a sample.

Discussion

This clinical description, morphological and chemical characterization of calcified leg ulcers in older patients allow a better understanding of the medical field in which DC occurs, better understanding of their pathogenesis and provide paths to prevent DC formation. In our study, the prevalence of DC within leg ulcer was 7%, affecting mainly women with chronic venous insufficiency and longer disease duration. These results are consistent with those reported in the literature. We also showed that patients with DC were more likely to have ulcers colonized by *P. aeruginosa* and hypercalcemia, which has never been identified before. We also provide innovative morphological and chemical analysis, and showed that DC were always composed of apatite, contained zinc and showed bacterial imprints.

In uremic calciphylaxis, a well described calcifying disorder, diabetes mellitus, higher body mass index, elevated calcium phosphate supersaturation and vitamin K antagonist treatments are associated with increased risk of subsequently developing the disease (23). In our study, there was no statistical difference between patients with and without DC regarding diabetes, obesity and vitamin K antagonist treatment. However, based on corrected serum calcium levels, patients with DC were statistically more likely to have hypercalcemia. These elevated serum calcium levels, associated to other local factors, might have played a role in our patients' DC formation. Nine of our ten patients with DC were women. Interestingly, many dermatosis associated to ectopic calcifications affect more women than men, such as calciphylaxis or pseudoxanthoma-elasticum. Oestrogen has been proven to be involved in vascular calcification formation, and might also play a role in DC formation as well (24).

Jünger et al. have associated venous insufficiency to chronic inflammation (25). In older patients, venous insufficiency often develops over decades, causing a long-term exposure to inflammation.

Interestingly, patients with DC within leg ulcer were statistically more likely to have venous insufficiency, some of which had been evolving over decades. Furthermore, using XRF, we showed that all DC contained zinc, an element that has been highly associated with the immune response and inflammation (26).

Chronic inflammatory states are associated with increased levels of reactive oxygen species that impair endothelial function and engenders vessel-wall abnormalities, including the presence of bone morphogenetic proteins in medial and intimal layers. Such vascular protein modification might explain the vascular calcifications observed in our cases, which probably affect both veins and arteries, as showed by incompressible ankle arteries found in 4 of our patients (27,28).

Systematically controlling chronic venous disease with compression bandages could help avoid chronic inflammation as well as the appearance of ulcers with calcified deposits.

The calcified deposits may also elicit a foreign body reaction in the wound thus perpetuating a chronic inflammatory state (5). The inflammation would lead to a vicious circle: inflammation would participate to create the calcifications, and in turn the calcifications would maintain the inflammation. Removing the DC, in addition to allowing the wound to close, would also break this vicious cycle.

These hypotheses can explain the formation of vascular DC. However, at least 4 of our patients also had subcutaneous DC associated to these vascular DC. Studies have reported microangiopathic changes and increased permeability of capillaries to low molecular weight molecules in chronic venous insufficiency (25). The calcium phosphate charged vesicles formed within the vessel wall could therefore pass from the vessel to the dermis, forming subcutaneous calcifications. Other studies suspect the role of dermal inflammation, induced by chronic venous insufficiency. They speculate that inflammation, through the production of metalloproteinase and free radicals, damages extracellular matrix proteins, including elastin, thus creating nucleation foci favoring calcium phosphate crystallization, and consecutively formation of subcutaneous DC (29,30).

However, not all patients suffering from chronic venous disease develop DC; chronic venous insufficiency cannot by itself explain their formation, and DC in leg ulcer are probably the consequence of multifactorial complex phenomena.

Using FE-SEM, we showed lacunar spheres within the calcification surface, of size compatible with bacterial imprints (cocci bacteria or cross cut gram negative bacilli), associated to intermingled fibrils of about 10 nm in diameter in one case, compatible with organized biofilm microorganisms. Interestingly, the two patients who presented those microscopic features were both colonized by *P aeruginosa* and had erysipelas. The role of bacteria has already been suspected in kidney and prostatic stones formation (17,18). These results, associated to the fact that most of our patients (80%) have developed erysipelas and/or *P aeruginosa* colonization of their wounds during hospitalization suggest the role of bacteria in DC formation. A better management of leg ulcer colonization to *P aeruginosa*, based on an adapted dressing, optimal debridement of the wound and frequent dressing's refection could help prevent DC formation in leg ulcers.

Using FE-SEM, we were also able to identify spherical calcified entities of 100–300 nm. We can hypothesize that the aggregation of these spherical entities leads to the formation of a larger calcified plaque: a similar mechanism has been identified in ectopic breast calcifications (31).

Although skin calcifications are usually composed of apatite, other chemical species, including calcite, have been previously reported (32,33). Dystrophic calcifications were composed of both

apatite and amorphous carbonated calcium phosphate. Interestingly, amorphous carbonated calcium phosphate has been associated in kidney stones to an infectious process (18). This result also goes toward the role of bacteria in DC formation.

Strengths and Limitations

To the best of our knowledge, our study is the first to show that *P aeruginosa*'s colonization and elevated serum calcium levels are statistically associated to DC. We also used powerful tools to perform the morphological and chemical characterization of DC in leg ulcers, which is undeniably an original and innovative approach. We provide innovative information regarding DC in older patients that may pave the way to therapeutic options.

However, this study also has some limits, including the fact that it is a monocentric study, and that number of patients included and of analyzed DC is limited. Furthermore, we only used palpation to diagnose DC and did not perform systematic x-ray of all patients. As the radiological resolution for detection of calcifications is known to be of about 200 μm , x-ray is more sensitive than palpation to diagnose DC and physicians can fail to detect them if only palpation is used (34). Therefore, we might have underestimated the prevalence of DC in our patients. A larger study, with a control group, and systematic realization of x-rays on patients who consulted with a leg ulcer would be interesting.

One of the innovative aspects of our study is the identification of zinc in all analyzed DC. Unfortunately, we could not easily associate zinc to clinical or biological inflammation in our patients. In order to do so, we should have evaluated, graded and analyzed, for each patient, inflammation of the skin surrounding the ulcer. Regarding biological inflammation, we intentionally did not use C-reactive protein (CRP): indeed, CRP levels are very fluctuant in patients with chronic wounds, as they often have intercurrent infections. Determining the right baseline CRP is therefore very hard and make comparison of CRP levels irrelevant.

In conclusion, our clinical, morphological, and chemical characterization of DC in leg ulcers brings about leads regarding ectopic calcification pathogenesis in older patients, and provides preventive and therapeutic options for calcified leg ulcers in older patients.

Dystrophic calcifications affected 7% of the patients hospitalized in our Geriatric ward with leg ulcers. Older patients with DC were more likely to have leg ulcers with venous insufficiency, colonized by *P aeruginosa*, with a longer healing evolution ($p = .0072$) and hypercalcemia. Geriatricians need to think of this condition when confronted to non-healing leg ulcers in older women suffering from chronic venous insufficiency. From a morphological point of view, the observation of lacunar spheres and intermingled fibrils within the DC surface observed in FE-SEM was consistent with the involvement of microorganisms and biofilm. From a chemical point of view, these calcifications were always composed of carbonated apatite and always associated to zinc, consistent with the involvement of an inflammatory process during DC formation.

Early management of venous insufficiency, treatment of chronic bacterial colonization and the use of calcium-solubilizing drugs would seem to be a rational preventive and therapeutic strategy for calcified leg ulcer in older patients.

Acknowledgments

We would like to thank Béatrice Fremcourt and Océane Pagni for their constant support.

Author Contributions

All authors contributed significantly to this work. Study concept and design: All; Acquisition of subjects: H.C., J.F., C.F., M.R., A.G., S.M.; Data analysis: H.C., D.B., E.L., V.F., M.D., S.R., N.L.; Data interpretation: All; Preparation of manuscript: All. Sponsor's Role: none.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Sen CK, Gordillo GM, Roy S, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen.* 2009;17(6):763–771. doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x
- Assurance Maladie. Prise en Charge des Plaies Chroniques 2015. www.ameli.fr/fileadmin/user_upload/documents/Ameliorer_la_prise_en_charge_des_plaies_chroniques.pdf.
- Reiter N, El-Shabrawi L, Leinweber B, Berghold A, Aberer E. Calcinosis Cutis. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65:15–22. doi:10.1016/j.jaad.2010.08.038
- Giachelli CM. Ectopic calcification: gathering hard facts about soft tissue mineralization. *Am J Pathol.* 1999;154(3):671–675. doi:10.1016/S0002-9440(10)65313-8
- Enoch S, Kupitz S, Miller DR, Harding KG. Dystrophic calcification as a cause for non healing leg ulcers. *Int Wound J.* 2005;2(2):142–147. doi:10.1111/j.1742-4801.2005.00096.x
- Lippmann HI, Goldin RR. Subcutaneous ossification of the legs in chronic venous insufficiency. *Radiology.* 1960;74:279–288. doi:10.1148/74.2.279
- Tokoro S, Satoh T, Okubo Y, Igawa K, Yokozeki H. Latent dystrophic subcutaneous calcification in patients with chronic venous insufficiency. *Acta Derm Venereol.* 2009;89(5):505–508. doi:10.2340/00015555-0680
- Wollina U, Hasenöhl K, Köstler E, et al. Dystrophic calcification in chronic leg ulcers—a clinicopathologic study. *Dermatologic Surgery.* 2009;35:457–461. doi:10.1111/j.1524-4725.2009.01064.x
- Al-Najjar M, Jackson MJ. Non-healing leg ulcers in a patient with dystrophic calcification and crest syndrome: a challenging clinical case. *Int Wound J.* 2011;8(5):537–541. doi:10.1111/j.1742-481X.2011.00834.x
- Reiter N, El-Shabrawi L, Leinweber B, Berghold A, Aberer E. Calcinosis cutis: part II. Treatment options. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65(1):15–22; quiz 23. doi:10.1016/j.jaad.2010.08.039
- Bazin D, Jouanneau C, Bertazzo S, et al. Combining field effect scanning electron microscopy, deep UV fluorescence, Raman, classical and synchrotron radiation Fourier transform Infra-Red Spectroscopy in the study of crystal-containing kidney biopsies. *Comptes Rendus Chimie.* 2016;19:1439–1450. doi:10.1016/j.crci.2015.03.001
- Briset F. Microscopie Électronique à Balayage et Microanalyses. *EDP Sciences*, 2012.
- Carden A, Morris MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *J Biomed Opt.* 2000;5(3):259–268. doi:10.1117/1.429994
- Daudon M, Bazin D. Vibrational spectroscopies to investigate concretions and ectopic calcifications for medical diagnosis. *Comptes Rendus Chimie.* 2016;19:1416–1423. doi:10.1016/j.crci.2016.05.011
- Rouzière S, Bazin D, Daudon M. In-lab X-ray fluorescence and diffraction techniques for pathological calcifications. *Comptes Rendus Chimie.* 2016;19:1404–1415. doi:10.1016/j.crci.2015.05.013
- Solé VA, Papillon E, Cotte M, Walter P, Susini JA. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.* 2007;62:63–68. doi:10.1016/j.sab.2006.12.002
- Dessombz A, Méria P, Bazin D, Daudon M. Prostatic stones: evidence of a specific chemistry related to infection and presence of bacterial imprints. *PLoS One.* 2012;7(12):e51691. doi:10.1371/journal.pone.0051691
- Carpentier X, Daudon M, Traxer O, et al. Relationships between carbonation rate of carapatite and morphologic characteristics of calcium phosphate stones and etiology. *Urology.* 2009;73(5):968–975. doi:10.1016/j.urology.2008.12.049
- Priester JH, Horst AM, Van de Werfhorst LC, Saleta JL, Mertes LA, Holden PA. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *J Microbiol Methods.* 2007;68(3):577–587. doi:10.1016/j.mimet.2006.10.018
- Romero R, Schaudinn C, Kusanovic JP, et al. Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(1):135.e1–135.e5. doi:10.1016/j.ajog.2007.11.026
- Bazin D, Carpentier X, Brocheriou I, et al. Revisiting the localisation of Zn(2+) cations sorbed on pathological apatite calcifications made through X-ray absorption spectroscopy. *Biochimie.* 2009;91(10):1294–1300. doi:10.1016/j.biochi.2009.05.009
- Rokita E, Hermes C, Nolting HF, Ryzek J. Substitution of Ca by Sr within selected Ca phosphates. *J Cryst Growth.* 1993;130:543–552. doi:10.1016/0022-0248(93)90543-6
- Nigwekar SU, Zhao S, Wenger J, et al. A nationally representative study of calcific uremic arteriolopathy risk factors. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(11):3421–3429. doi:10.1681/ASN.2015091065
- McRobb LS, McGrath KCY, Tsatralis T, et al. Estrogen receptor control of atherosclerotic calcification and smooth muscle cell osteogenic differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(6):1127–1137. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309054
- Jünger M, Steins A, Hahn M, Häfner HM. Microcirculatory dysfunction in chronic venous insufficiency (CVI). *Microcirculation.* 2000;7(6 Pt 2):S3–12.
- Bonaventura P, Benedetti G, Albarède F, Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev.* 2015;14(4):277–285. doi:10.1016/j.autrev.2014.11.008
- Sowers KM, Hayden MR. Calcific uremic arteriolopathy: pathophysiology, reactive oxygen species and therapeutic approaches. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(2):109–121. doi:10.4161/oxim.3.2.11354
- Nigwekar SU, Jiramongkolchai P, Wunderer F, et al. Increased bone morphogenetic protein signaling in the cutaneous vasculature of patients with calciphylaxis. *Am J Nephrol.* 2017;46(5):429–438. doi:10.1159/000484418
- Munavalli G, Reisenauer A, Moses M, Kilroy S, Arbiser JL. Weight loss-induced calciphylaxis: potential role of matrix metalloproteinases. *J Dermatol.* 2003;30(12):915–919. doi:10.1111/j.1346-8138.2003.tb00348.x
- Piry A, Vin F, Allaert FA. [Inflammation and subcutaneous calcification of venous origins]. *Phlebologie.* 1992;45(1):41–7; discussion 48.
- Lakhdar AB, Daudon M, Mathieu MC, Kellum A, Balleyguier C, Bazin D. Underlining the complexity of the structural and chemical characteristics of ectopic calcifications in breast tissues through FE-SEM and μ FTIR spectroscopy. *Comptes Rendus Chimie.* 2016;19:1610–1624. doi:10.1016/j.crci.2015.03.011
- Colboc H, Moguelet P, Bazin D, et al.; Groupe Anglo-Dermatologie of the French Society of Dermatology. Localization, morphologic features, and chemical composition of calciphylaxis-related skin deposits in patients with calcific uremic arteriolopathy. *JAMA Dermatol.* 2019;155(7):789–796. doi:10.1001/jamadermatol.2019.0381
- Colboc H, Moguelet P, Bazin D, et al. Physicochemical characterization of inorganic deposits associated with granulomas in cutaneous sarcoidosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33(1):198–203. doi:10.1111/jdv.15167
- Henrot P, Leroux A, Barlier C, Génin P. Breast microcalcifications: the lesions in anatomical pathology. *Diagn Interv Imaging.* 2014;95(2):141–152. doi:10.1016/j.diii.2013.12.011

3) Calcinosis cutis au cours de la nécrolyse épidermique : rôle de la caspofungine ?
(article publié dans le Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology)

Le syndrome de Lyell, ou nécrolyse épidermique toxique, est une forme extrêmement grave d'allergie médicamenteuse. Il se caractérise par une destruction aiguë et étendue de l'épithélium de la peau et des muqueuses. À la phase d'état, la nécrolyse épidermique se présente typiquement dans les régions atteintes un décollement épidermique en « linge mouillé ». Tout traumatisme « arrache » des lambeaux d'épiderme (signe de Nikolsky) et fait place à un derme rouge suintant. La totalité du tégument peut être atteinte, mais également les différentes muqueuses (ophtalmique, respiratoire, digestive...).

Il s'agit d'une pathologie extrêmement grave, avec une mortalité de l'ordre de 30 % et un risque important de séquelles. Les complications immédiates de la nécrolyse épidermique sont identiques à celles observées dans les brûlures étendues : pertes liquidiennes importantes conduisant à une hypovolémie sévère avec risque d'insuffisance rénale fonctionnelle puis organique et de défaillance cardiaque, infections systémiques graves, troubles de la thermorégulation, augmentation de la consommation énergétique, et anomalies de la réponse immune.

Un médicament peut être imputé de manière plausible dans 70 % des cas environ, essentiellement les sulfamides antibactériens, de nombreux anti comitiaux, l'allopurinol et certains anti-inflammatoires non stéroïdiens. La physiopathologie reste mal connue, liée à un processus immunologique probablement cytotoxique à médiation cellulaire. Le traitement, essentiellement symptomatique, est au mieux conduit en unité de soins intensifs.

Généralement, la cicatrisation cutanéomuqueuse commence vers le 8e jour après le début des symptômes et se poursuit sur 2 à 3 semaines. La publication suivante rapporte la description de quatre patients, admis en réanimation pour syndrome de Lyell et dont l'évolution était caractérisée par des troubles de cicatrisation avec calcifications dermiques.

Nous avons réalisé une analyse physico-chimique précise de ces calcifications, ainsi qu'une étude immuno-histochimique, pour tenter d'en comprendre l'origine.

LETTER TO THE EDITOR

Calcinosis cutis in epidermal necrolysis: role of caspofungin?

Dear Editor,

Toxic epidermal necrolysis (TEN) is a rare life-threatening condition, usually drug-induced, characterized by a diffuse epidermal and mucosal detachment. Skin histology reveals pan epidermal necrolysis. Mucocutaneous healing usually lasts 2–3 weeks.¹ Calcinosis cutis is reported in various skin diseases, with dystrophic calcification following tissue damage being its most common cause.² We describe four patients who presented TEN and atypical healing retardation due to calcinosis cutis.

Between 2015 and September 2021, four patients, three males and one female, aged from 40 to 59 years old, were diagnosed with TEN, idiopathic or following intake of ibuprofen, pantoprazole and allopurinol respectively. Three to 22 days following the beginning of cutaneous healing, they presented a secondary cutaneous detachment with atone fibrinous plaques (Fig. 1). A new biopsy revealed in the four cases calcium deposition in the superficial dermis and in the epidermis (Fig. 2a). Ionized serum calcium and phosphate levels were normal. One patient died without healing, whereas complete healing was slowly obtained within 5.5 and 11 months for two patients, and is still ongoing for one.

To investigate the origin of these cutaneous calcifications, osteogenic markers, assessed by immunohistochemistry were performed in three patients. Results were negative on keratinocytes and fibroblasts, making unlikely trans-differentiation

of these cells to an osteochondrogenic phenotype, a mechanism frequently suspected in calciphylaxis.³ μ Fourier transform infrared spectroscopy revealed that calcifications consisted of apatite, a classic component of dystrophic skin calcifications observed in other diseases.^{2,4} Field emission scanning electron microscopy revealed that the ultrastructure of these skin calcifications consisted of small spherical entities of 500 nm aggregating into voluminous plaques (Fig. 2b–d), as previously described in other ectopic calcifications.⁵ These spherical entities were also identified within the papillary dermis (Fig. 2e,f). Calcium-phosphate nature of these entities was confirmed by energy dispersive X-ray spectroscopy.

Reviewing the medical chart, we found that the four patients were treated with caspofungin for invasive fungal infection to *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae*, *Candida albicans* or non-documented septic shock 1–8 days before the secondary epidermal detachment. Among the 130 patients with Stevens–Johnson syndrome or TEN referred in our centre between 2015 and 2021, four other patients with TEN received caspofungin: three died in the following days without any dermatological examination. In the fourth case, new fibrinous plaques were described in the medical chart 4 days later, without imaging or histology performed.

We report herein four patients with TEN exhibiting calcinosis cutis after caspofungin administration. Caspofungin is an agonist of ryanodine receptor (RyR).^{6,7} RyR is strongly expressed in keratinocytes and application of RyR's agonist induced

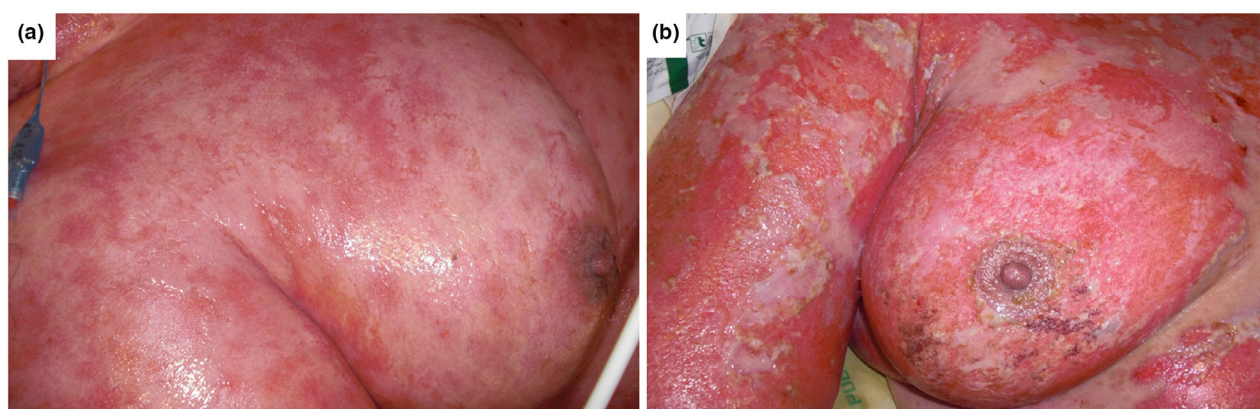


Figure 1 Clinical presentation of one patient. (a) Dermatological examination on day 12, revealing almost complete mucocutaneous healing. (b) Dermatological examination on day 29, 11 days after the introduction of caspofungin, revealing diffuse epidermal detachment associated with the presence of fibrinous plaques.

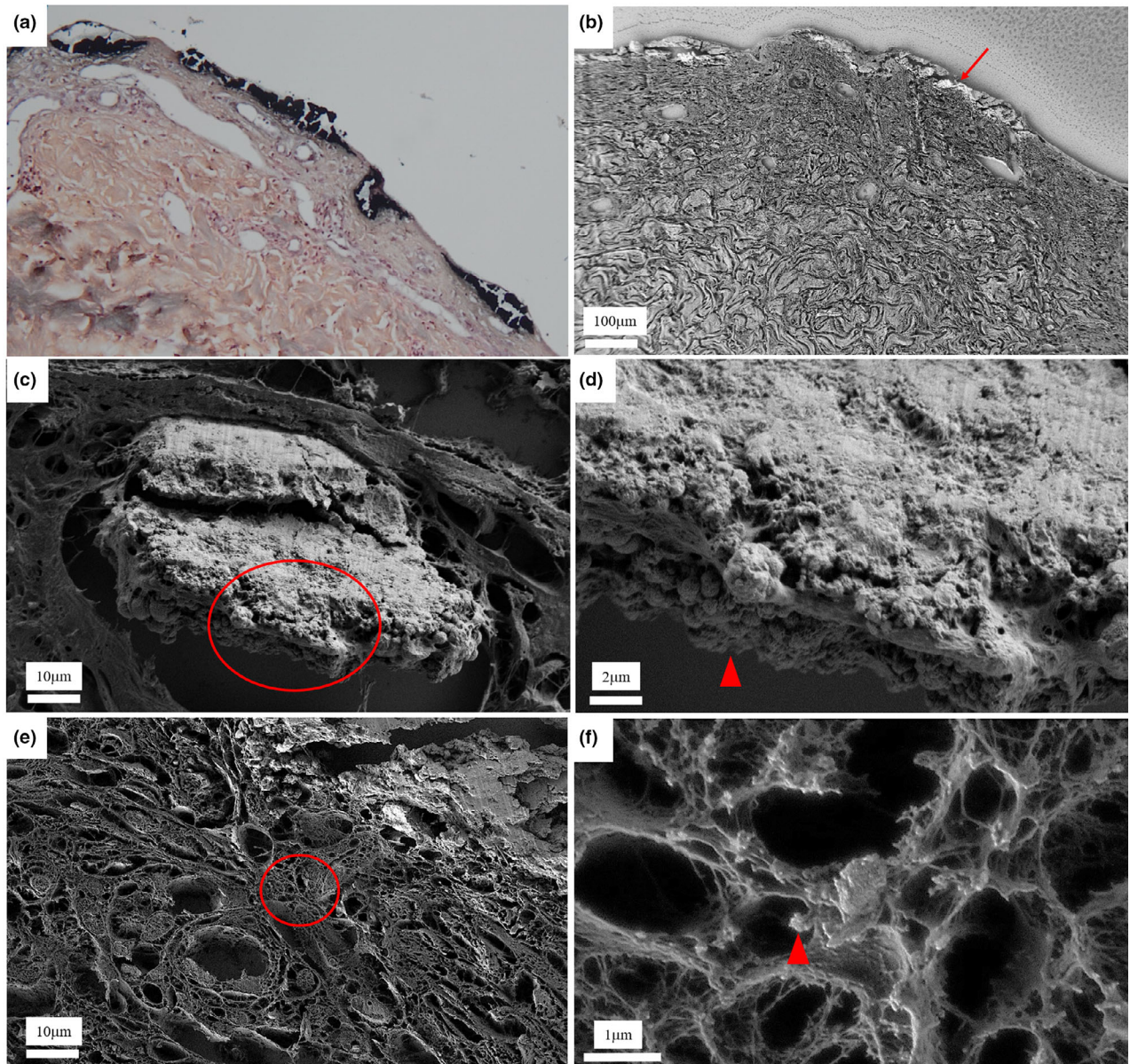


Figure 2 Skin biopsy sections. Diffuse necrosis of the corneal layer associated with calcium deposition in the superficial dermis. (a) Von Kossa staining ($\times 100$). (b) Field emission scanning electron microscopy. Arrow indicates the voluminous calcifications. (c–f) Field emission scanning electron microscopy. (c) The lower part of the voluminous calcification (circle) consists of many small aggregated spherical entities. (d) High magnification of panel (c) circled area. (e) Papillary dermis below voluminous calcification. (f) High magnification of panel (e) circled area, showing many spherical calcifications within the papillary dermis.

intracellular calcium flux, leading to delayed cutaneous healing in a mouse model.⁸ By modifying keratinocytes' calcium intracellular concentration, caspofungin might have altered the new keratinocytes at the very initial stage of cutaneous healing, explaining the presence of upper dermis and epidermal calcifications and the relapse of epidermal detachment followed by a major healing retardation.

Calcifications were small spherical entities aggregated into voluminous plaques contiguous to the epidermal necrosis, made of apatite, and were not caused by trans-differentiation of the skin cells into an osteochondrogenic phenotype. Presence of calcified entities within the upper but not the deeper dermis suggests a link between local inflammation induced by TEN and calcifications, as observed in other dystrophic calcified skin

diseases. Skin calcifications have also been described in other diseases associated with diffuse epidermal detachment, such as porphyria cutanea tarda and dystrophic epidermolysis bullosa.^{9,10}

Liposomal amphotericin B or fluconazole might, therefore, be preferred for these patients in case of invasive fungal infection. Further studies regarding dermatological adverse events induced by caspofungin, especially on mucocutaneous healing, should be performed.

Acknowledgements

The patients in this study have given written informed consent to publication of their case details.

Conflict of interest

All authors have any conflicts of interest to declare.

Funding sources

None declared.

Data Availability Statement

Derived data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

H. Colboc,^{1,2,*†} T. Bettuzzi,^{3,4,5,†} M. Badrignans,⁶
D. Bazin,⁷ A. Boury,⁷ E. Letavernier,^{2,8} V. Frochot,^{2,8}
E. Tang,² P. Moguelet,⁹ N. Ortonne,⁵ N. de Prost,¹⁰
S. Ingen-Housz-Oro^{3,4,5}

¹Service Plaies et Cicatrisation, Sorbonne Université, Hôpital Rothschild, Paris, France, ²UMR_S 1155, Sorbonne Université-UPMC Paris 06, Paris, France, ³Service de Dermatologie, Hôpital Henri Mondor, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Créteil, France, ⁴Univ Paris Est Créteil, EpiDermE, Créteil, France, ⁵Reference Center for Toxic Bullous Dermatoses and Severe Drug Reactions TOXIBUL, Créteil, France, ⁶Service de Pathologie, Hôpital Henri Mondor, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Créteil, France, ⁷CNRS, IPC, Ba340, Université Paris

XI, Orsay, France, ⁸Service des Explorations Fonctionnelles Multidisciplinaires, Sorbonne Université, Hôpital Tenon, Paris, France, ⁹Service de Pathologie, Sorbonne Université, Hôpital Tenon, Paris, France, ¹⁰Service de Réanimation Médicale, Hôpital Henri Mondor, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Créteil, France

*Correspondence: H. Colboc. E-mail: hester.colboc@aphp.fr

†These authors equally contributed to this work.

References

- Ingen-Housz-Oro S, Duong T-A *et al.* Epidermal necrolysis French national diagnosis and care protocol (PNDS; protocole national de diagnostic et de soins). *Orphanet J Rare Dis* 2018; **13**: 56.
- Reiter N, El-Shabrawi L, Leinweber B, Berghold A, Aberer E. Calcinosis cutis. *J Am Acad Dermatol* 2011; **65**: 15–22.
- Nigwekar SU, Thadhani R, Brandenburg VM. Calciphylaxis. *N Engl J Med* 2018; **378**: 1704–1714.
- Carden A, Morris MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues. *J Biomed Opt* 2000; **5**: 259–268.
- Lakhdar AB, Daudon M, Mathieu MC, Kellum A, Balleyguier C, Bazin D. Underlining the complexity of the structural and chemical characteristics of ectopic calcifications in breast tissues through FE-SEM and μ FTIR spectroscopy. *CR Chim* 2016; **19**: 1610–1624.
- Müller S, Koch C, Weiterer S, Weigand MA, Sander M, Henrich M. Caspofungin induces the release of Ca^{2+} ions from internal stores by activating ryanodine receptor-dependent pathways in human tracheal epithelial cells. *Sci Rep* 2020; **10**: 11723.
- Koch C, Jersch J, Schneck E *et al.* Caspofungin modulates ryanodine receptor-mediated calcium release in human cardiac myocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**: e01114–e1118.
- Denda S, Kumamoto J, Takei K, Tsutsumi M, Aoki H, Denda M. Ryanodine receptors are expressed in epidermal keratinocytes and associated with keratinocyte differentiation and epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2012; **132**: 69–75.
- Rey J, Hesse S, Bonerandi JJ. Extensive calcifications of the scalp in a patient with porphyria cutanea tarda secondary to hepatitis C virus infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; **21**: 286–287.
- Bhari N, Bharti P. Dystrophic calcinosis cutis in autosomal recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *BMJ Case Rep* 2019; **12**: e231287.

DOI: 10.1111/jdv.17808

4) **Caractérisation physico-chimique des dépôts inorganiques associés aux granulomes sarcoïdiques cutanés** (*article publié dans le Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*)

La sarcoïdose est une maladie pouvant toucher de nombreux organes, en particulier les poumons et la peau, organes exposés directement aux agents minéraux extérieurs. La peau est atteinte dans 25 à 30% des cas. Les lésions cutanées sont très variées, et peuvent être à type de papules, lésion annulaire, éruption maculo-papuleuse ou de lupus pernio. L'atteinte pulmonaire est sévère dans 10% des cas, conduisant à une fibrose et à une insuffisance respiratoire chronique.

La maladie débute généralement entre trente et quarante ans. Elle est plus fréquente chez les femmes et chez les patients d'origine africaine ou antillaise. La cause de la maladie demeure inconnue, et celle-ci est probablement la conséquence d'une réponse immunitaire dérégulée vis-à-vis d'agents bactériens et environnementaux sur un terrain génétique prédisposant.

Le diagnostic de la maladie repose sur la biopsie, en particulier cutanée en cas de lésions dermatologiques. On retrouve la présence de granulomes épithélioïdes gigantomaculaires, sans nécrose caséuse.

Bien que la cause exacte de la maladie demeure inconnue, le rôle des agents inorganiques, en particulier des particules environnementales minérales telle que la silice, est suspecté.

L'atteinte fréquente par la sarcoïdose cutanée des zones cicatricielles ainsi que des zones tatouées corroborent cette hypothèse. Par ailleurs, la présence de corps étrangers biréfringents en lumière polarisée au centre des granulomes cutanés dans les sarcoïdoses systémiques est décrite, jusqu'à 22% dans la série de Marcoval et al ¹²². Ces dépôts pourraient correspondre à des particules minérales et favoriser la survenue de la maladie.

Par ailleurs, 10% des patients atteints de sarcoïdose présentent une hypercalcémie d'origine encore indéterminée, mais probablement liée à la production dérégulée par les granulomes de vitamine D. Ces désordres pourraient conduire à des dépôts tissulaires calciques ectopiques, en particulier cutanés ; la littérature rapporte ainsi un cas de calcifications sous cutanées multiples chez un patient présentant une hypercalcémie et une hyperphosphatémie satellite d'une sarcoïdose avec atteinte pulmonaire ¹³⁰.

Dans le cadre de ma thèse, l'étude de cette pathologie, associée à la fois à la présence de dépôts minéraux exogènes et de dépôts calciques endogènes est particulièrement intéressante. La publication suivante présente les résultats de l'analyse physico-chimique de ces différents dépôts.

SHORT REPORT

Physicochemical characterization of inorganic deposits associated with granulomas in cutaneous sarcoidosis

H. Colboc,^{1,2,*} P. Moguelet,^{3,†} D. Bazin,^{4,5,†} C. Bachmeyer,⁶ V. Frochet,^{7,8} R. Weil,⁵ E. Letavernier,^{7,8} C. Jouanneau,⁸ M. Daudon,^{7,8,‡} J.F. Bernaudin^{2,9,‡}

¹Dermatologie, Hôpital Rothschild, AP-HP, Paris, France

²Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, Paris, France

³Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris, France

⁴Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, Collège de France, CNRS, Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, Paris, France

⁵CNRS, LPS, Ba510, Université Paris XI, Orsay, France

⁶Médecine Interne, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris, France

⁷UMR S 1155, Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, Paris, France

⁸Explorations Fonctionnelles Multidisciplinaires, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris, France

⁹Pneumologie, Hôpital Avicenne, APHP et EA2363 Université Paris 13, Bobigny, France

*Correspondence: H. Colboc. E-mails: hester.colboc@aphp.fr; hestercolboc@gmail.com

Abstract

Background Sarcoidosis, characterized by epithelioid granulomas, is considered to be caused by a complex interplay between genetics and environmental agents. It has been hypothesized that exogenous inorganic particles as crystalline silica could be a causal or adjuvant agent in sarcoidosis onset.

Objectives To investigate the location, frequency and physicochemical characteristics of foreign materials and mineral tissue deposits in the granulomatous area of cutaneous sarcoidosis.

Methods Skin biopsies ($n = 14$) from patients diagnosed with cutaneous sarcoidosis (mean age 43 years; 11 patients with extracutaneous involvement) were investigated using polarized light examination (PLE), μ Fourier Transform Infra-Red (μ FT-IR) spectroscopy and Field Emission Scanning Electron Microscopy coupled with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (FE-SEM/EDX).

Results Combined PLE, μ FT-IR, FE-SEM/EDX analysis allowed to characterize mineral deposits in 7/14 biopsies (50%). It identified crystalline silica (SiO_2) inside granulomas in three biopsies and calcite (CaCO_3) at their periphery in 4.

Conclusion This study emphasizes the need of using combined methods for assessment of mineral deposits in granulomatous diseases. According to the location and characteristics of deposits, we can hypothesize that SiO_2 particles contribute to the granuloma formation, whereas CaCO_3 deposits are related to the granuloma biology. However, the significance of the association between SiO_2 deposits and sarcoidosis is still disputed.

Received: 13 April 2018; Accepted: 18 June 2018

Conflict of interest

None declared.

Funding sources

None declared.

Introduction

Sarcoidosis is characterized by an exaggerated granulomatous response mostly affecting the lung, skin and eye, locations particularly exposed to exogenous particulates.^{1,2} Granuloma mostly constituted of macrophage lineage cells is thought to be

controlled by innate as well as adaptive immune mechanisms in a complex combination of genetic susceptibility, immune networks and infectious and/or environmental agents.³

Sarcoidosis affects the skin in 25–30% of patients and manifests by a wide range of clinical cutaneous lesions.^{4,5} It is well known that sarcoidosis preferentially affects sites with a prior injury as tattoos or scars. Polarizable material has been reported

[†]These authors contributed equally to this work.

[‡]These authors should be considered joint last authors

up to 22% of the cases suggesting that foreign material could be a nidus for granuloma formation and a potential trigger for the disease.^{6–8}

This study, based on a series of cutaneous biopsies of sarcoidosis, was designed to investigate the frequency and physicochemical characterization of mineral deposits in the granulomatous areas. To describe their characteristics at the sub-cellular scale as well as their chemical nature, in addition to polarized light examination (PLE), two different techniques of physicochemical analysis were used: μ Fourier Transform Infra-Red (μ FT-IR) spectroscopy and Field Emission Scanning Electron Microscopy coupled with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (FE-SEM/EDX).⁹ Such a combination of methods has been amply demonstrated to be particularly effective for detection and physicochemical identification of inorganic/mineral deposits in various tissue samples.¹⁰

Material and methods

Skin biopsies, histopathology and polarized light examination

The study was conducted in compliance with Good Clinical Practices and the Declaration of Helsinki, according to French law.

A retrospective monocentric study was conducted, from January 2012 to December 2015. Consecutive patients diagnosed with skin sarcoidosis during this period, based on clinical data and histopathology results, were included. Clinical and biological data, including demographic, occupation, past medical history, extracutaneous involvement of the disease, clinical description and location of the skin lesions, calcium and angiotensin-converting enzyme serum levels were collected.

Five samples from negative margins of skin carcinoma resections were included and further described as controls.

Multiples sections of 1.5 μ m from paraffin-embedded skin biopsies were obtained and deposited on two types of slides: glass slides, for haematoxylin-eosin-saffron (HES), and low-e microscope slides (MirrIR; Kevley Technologies, Tienta Sciences, Indianapolis, IN, USA) for FE-SEM/EDX and μ FT-IR. The location (superficial and deep dermis, sub-cutis) and number of granulomas observed per biopsy were evaluated. A screening by PLE was performed by two different pathologists.

Skin sections were analysed and compared between cases and controls, for the presence of abnormal deposits.

Physicochemical analysis of mineral deposits

The tools and methods have been extensively described in a thematic issue of the Comptes Rendus Chimie de l'Académie des Sciences Paris France.¹¹

Briefly, for μ FT-IR, tissue sections deposited on low-e microscope slides were analysed with the Spotlight 400 FTIR Imaging System (Perkin Elmer Life Sciences – Courtaboeuf, France), in

the mid-infrared (4000–700 cm^{-1}) spectral range to obtain infrared maps of tissue slides at high spatial resolution, down to 10 μm .⁹

For FE-SEM/EDX the sections previously used for μ FT-IR were observed on a Zeiss SUPRA55-VP SEM (Zeiss SUPRA55-VP – Oberkochen, Germany) equipped with in-lens SE and Everhart–Thornley SE secondary electron detectors.¹² Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) coupled to FE-SEM observation was used to confirm the nature of the deposits.

Table 1 Demographic, clinical and histopathological data of cases

	N (%)
Patient's characteristics	14
Men/Female	9/5
Age at inclusion (years)	43 (23–68)
Type of lesions	
Nodules	7 (50)
Papules	6 (43)
Plaques	1 (7)
Localization	
Lower limbs	5 (36)
Face	5 (36)
Upper Limbs	4 (29)
Trunk	2 (14)
Treatment	
Hydroxychloroquine	7 (50)
Systemic corticosteroids	5 (36)
Immunosuppressive therapy	4 (29)
Local corticosteroids	2 (14)
No treatment	1 (7)
Extracutaneous localizations	11 (79)
Pulmonary	10 (71)
Renal	2 (14)
Osteo-articular	2 (14)
Neurological	1 (7)
Ophthalmological	1 (7)
Occupational exposure to mineral dusts	4 (29)
Biology	
Hypercalcemia*	2 (14)
Elevated angiotensin-converting enzyme level	4 (29)
Number of granulomas per section	
≤10	5 (33)
10–50	6 (40)
>50	4 (26)
Localization of the granulomas	
Superficial dermis	11 (73)
Deep dermis	10 (67)
Hypodermis	5 (33)
Presence of refractive material	5 (33)

*Defined as serum calcium level >2.6 mmol/l.

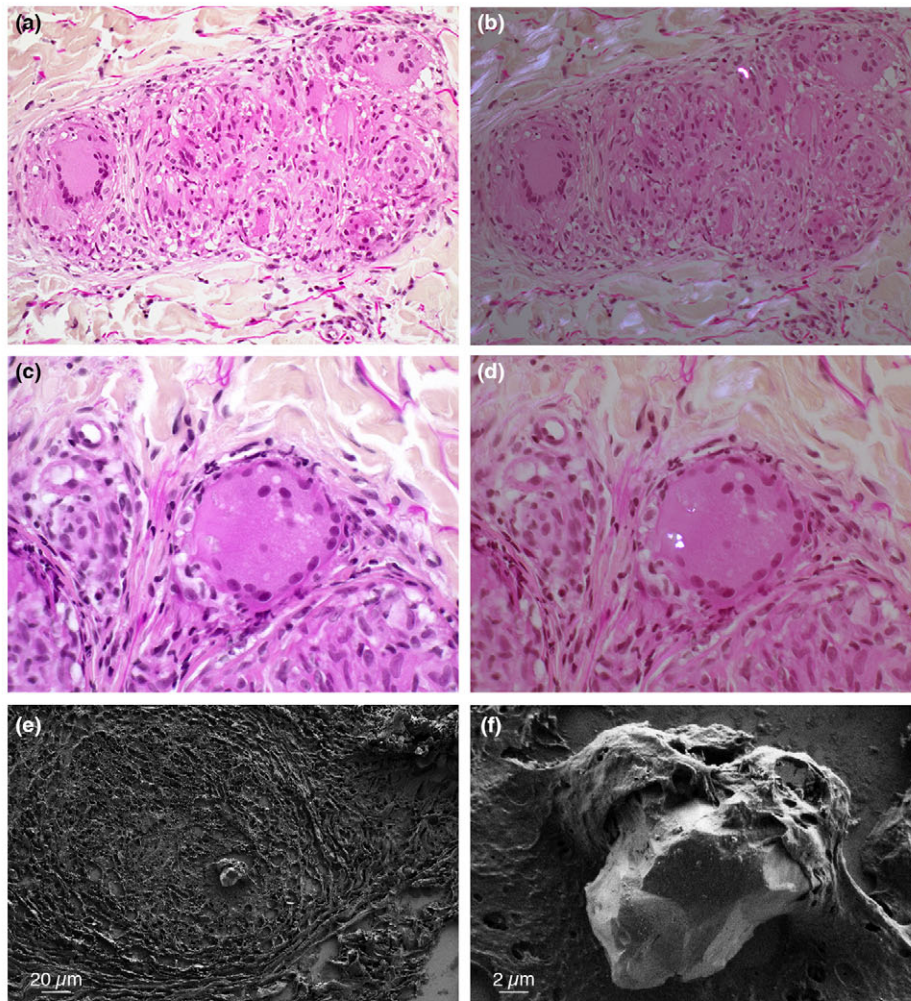


Figure 1 Optic microscopy, PLE and SEM of granulomas in cutaneous sarcoidosis. (a) Optic microscopy of a characteristic cutaneous granuloma (HES $\times$ 200). (b) PLE of the same granuloma, showing birefringent particles. (c) Optic microscopy of another granuloma (HES $\times$ 400). (d) PLE, showing birefringent particles. (e–f) SEM photographs showing an intragranuloma inorganic deposit at two magnifications.

Results

Skin biopsies, histopathology and polarized light examination (PLE)

Sixteen patients were diagnosed with skin sarcoidosis at Tenon Hospital from January 2012 to December 2015. Two patients were excluded because the tissue sample available for analysis was too small. Finally, cutaneous biopsies from 14 patients (nine men; five women) were selected for further analysis. Demographic, clinical and histopathological characteristics of all patients are summarized in Table 1 and for each patient in Table S1. Eleven patients had associated extracutaneous localizations of sarcoidosis mostly pulmonary ($n = 10$). One of the three patients without extracutaneous localization, (patient 8 in

Table S1) had a single granulomatous lesion of the forehead and the diagnosis of “localized sarcoidosis-like granulomatous reaction” could not be excluded. For PLE from 4 to 33 (mean = 16) sections per biopsy were analysed. Refractive material was detected in five biopsies, restricted to one or two granulomas per section (Fig. 1). Interstitial peri granulomatous fibrosis was observed in 13 cases without any polarized signal observed in this area.

Physicochemical analysis of mineral deposits

Intra granuloma mineral silica (SiO_2) deposits In three biopsies with PLE refractive material, $\mu\text{FT-IR}$ characterized mineral silica deposits (Fig. 2).

FE-SEM observation showed that silica particles were inside the granulomas. In two samples, the deposits were sharp,

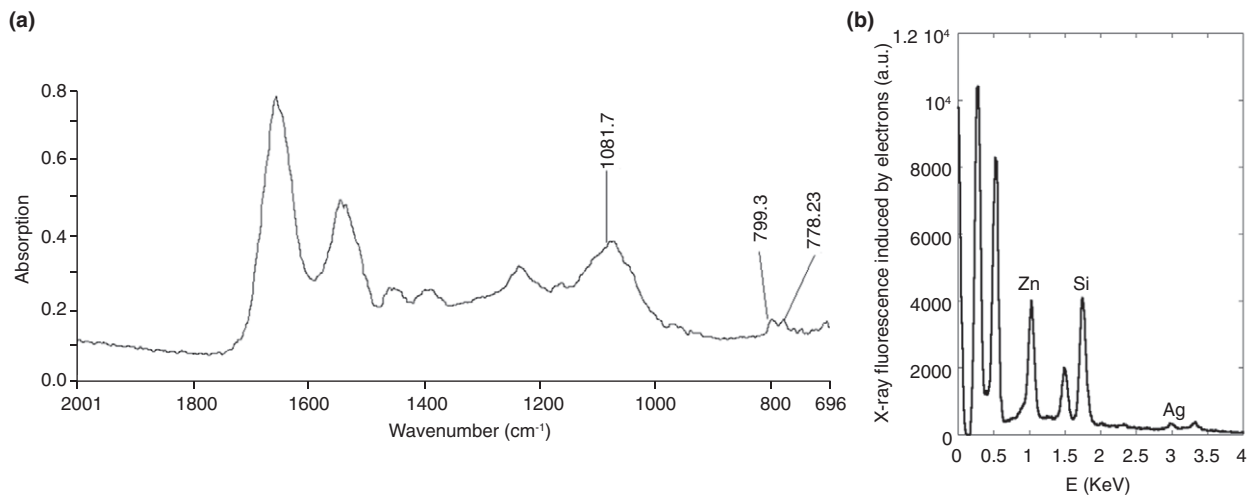


Figure 2 Examples of physicochemical analysis of the mineral silica (SiO_2) deposits observed within a granuloma. (a) $\mu\text{FT-IR}$ microspectroscopy: IR spectrum showing the characteristic signals of silica in the protein matrix of a granuloma. (b) FE-SEM/EDX the EDAX spectrum identifies the presence of a significant signal related to silicon (Si) in the deposit (1.740 keV/cm).

unique, irregular objects more than 10 μm long. In the third, the deposit was an aggregate of very small objects some of them at the nanoparticle scale. No other nanoparticles of SiO_2 were observed within the granuloma or in its vicinity. EDX analysis confirmed the presence of silica in these three samples (Fig. 2).

Peripheral calcium carbonate (CaCO_3) deposits $\mu\text{FT-IR}$ analysis of four biopsies detected calcite (CaCO_3) deposits in the form of calcite at the periphery of the granulomas. FE-SEM/EDX showed aggregates of submicrometer spherical deposits of calcite located between the collagen fibres (Fig. 3). Two of these four patients had hypercalcemia.

Controls

Similar analyses were performed on the five samples from the control group, no deposits were found either in dermis or subcutis.

Discussion

Using combined methods, we yield comprehensive information on the location and physicochemical nature of inorganic deposits in granulomas (crystalline silica SiO_2) and perigranuloma tissues (calcite CaCO_3) in patients with cutaneous sarcoidosis. We identified crystalline silica (SiO_2) inside granulomas in three biopsies and calcium carbonate (CaCO_3) at their periphery in 4.

Refractive material was observed by PLE in five biopsies (35%) which is in accordance with the 20–78% reported range.⁷ In our series, $\mu\text{FT-IR}$ showed silica deposits in three biopsies (21%) which has been confirmed to be crystalline silica by FE-SEM/EDX. For one of these biopsies, the PLE examination was

negative, while for three PLE positive samples infrared spectroscopy identified calcium carbonate deposits.

Crystalline silica was identified in granulomas in three biopsies from environment exposed skin areas (elbow, arm and forehead). This finding is in keeping with the origin of SiO_2 deposits in relation to environmental or occupational exposure. For one patient the area has previously been affected by a trauma which could have been responsible for deposition of foreign bodies. Accordingly to epidemiological studies, crystalline silica has been suggested to play a role in sarcoidosis occurrence particularly after environmental or occupational exposure.¹³ However, in the present study identification of SiO_2 particles has been a particularly rare event affecting at least one granuloma section among a mean of 75 analysed per biopsy. But it cannot be excluded that the frequency of deposits was largely underestimated. As each granuloma has a mean diameter of at least 150–200 μm ,¹⁴ 5 μm sections correspond to a very limited fraction of the lesion. In addition, loss of these hard particles deposits may occur during the processing of tissue sample particularly at the sectioning step. SEM examination showed that SiO_2 particles were observed as unique intracellular deposits. It has been hypothesized that nanoparticles of silica undetected by PLE could be a causative agent in sarcoidosis.¹⁵ The significance of the frequent association between foreign material and sarcoidosis is still controversial.⁸ Foreign bodies may be initial triggers for sarcoidosis constituting the nidus for granulomas in patients with a particular genetic background having an impaired capacity to handle particulate foreign material.^{16,17} Conversely, another hypothesis is to consider granuloma in sarcoidosis as a host related inflammatory/immune reaction non-specific of a special antigen or

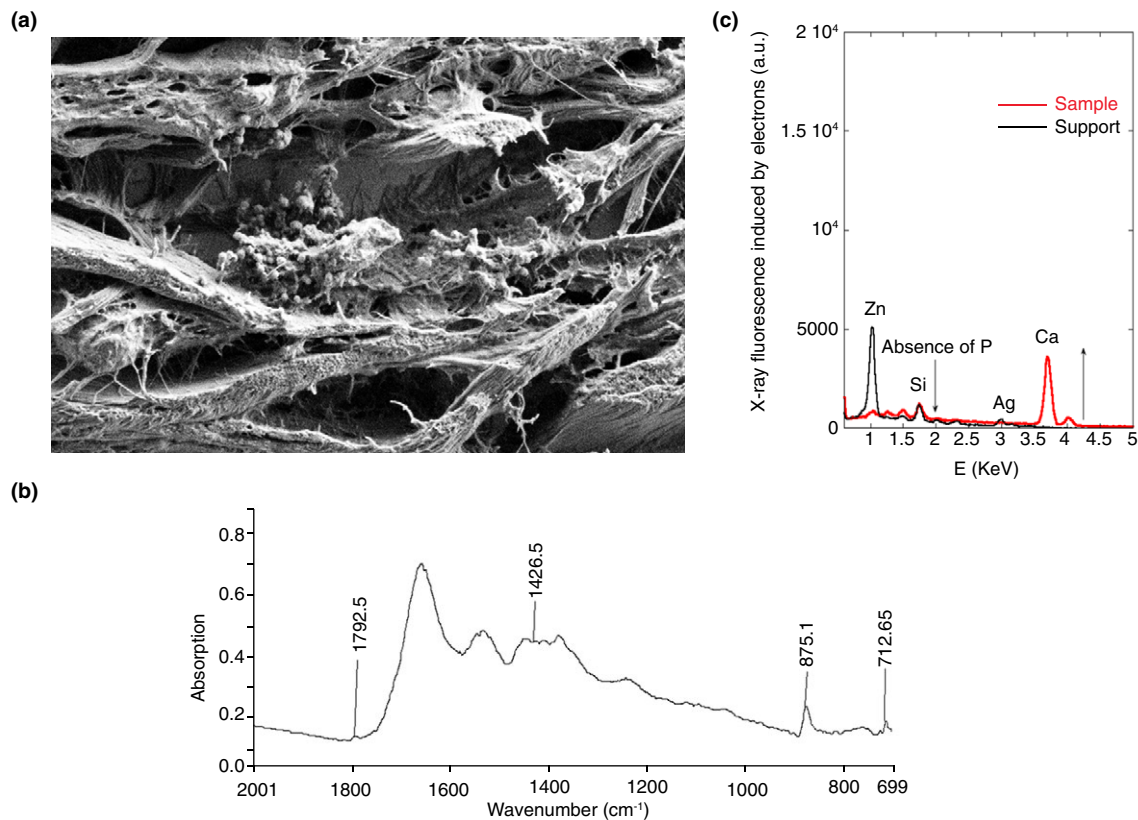


Figure 3 Detection and physicochemical analysis of calcite (CaCO_3) deposits at the periphery of granulomas. (a) SEM photograph showing aggregates of submicrometer spherical deposits localized between the collagen fibres (arrow). (b) $\mu\text{FT-IR}$ microspectroscopy: IR spectrum showing the characteristic peaks of calcite (CaCO_3). (c) FE-SEM/EDX: the EDAX spectrum identifies the presence of a significant signal related to calcium (Ca; 3.7 keV) and the absence of a signal from phosphorus (P; 2.01 keV) in line with the FTIR spectrum identifying calcite (CaCO_3).

particulate occurring at sites where potential incidental triggering agents (scars, foreign material, antigens...) are already located. In line with this hypothesis is the observation of granuloma recurrence on tattoos or scars in parallel with exacerbation or relapse of systemic sarcoidosis.¹⁸

Calcite deposits were observed at distance from granulomas, within the connective tissue of dermis in four patients, two with hypercalcemia. Calcium oxalate and phosphate deposits have been reported in sarcoidosis, however, to the best of our knowledge, we report the first cases of calcite deposits.¹⁹ Presence at the nanometre scale of these deposits, including in patients with normal serum calcium level, raises the question that calcium carbonate deposits in tissues around granulomas could be a common not yet highlighted finding in conjunction with the role of the granuloma in vitamin D and calcium metabolism.²⁰

In conclusion, such a study needs to be extended to samples from other organs affected by sarcoidosis, mostly lung and mediastinal lymph nodes exposed to environmental and

occupational pollutants. Moreover, the consequence of calcite deposits in organs where granulomas develop should be investigated.

Acknowledgements

We thank Pr Camille Frances, from the department of Dermatology Tenon Hospital Paris, Prs Dominique Valeyre and Jean-Paul Battesti, from Avicenne Hospital Bobigny France and PA Rosental from Sciences Po Paris for their constant support and fruitful discussions.

Reference

- 1 Valeyre D, Prasse A, Nunes H, Uzunhan Y, Brillet P-Y, Müller-Quernheim J. Sarcoidosis. *Lancet* 2014; **383**: 1155–1167.
- 2 Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA et al. Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164**: 1885–1889.
- 3 Müller-Quernheim J, Schürmann M, Hofmann S et al. Genetics of sarcoidosis. *Clin Chest Med* 2008; **29**: 391–414.

- 4 Wanat KA, Rosenbach M. Cutaneous sarcoidosis. *Clin Chest Med* 2015; **36**: 685–702.
- 5 Haimovic A, Sanchez M, Judson MA, Prystowsky S. Sarcoidosis: a comprehensive review and update for the dermatologist: part II. Extracutaneous disease. *J Am Acad Dermatol* 2012; **66**: 719–730.
- 6 Callen JP. The presence of foreign bodies does not exclude the diagnosis of sarcoidosis. *Arch Dermatol* 2001; **137**: 485–486.
- 7 Marcoval J, Moreno A, Maña J. Foreign bodies in cutaneous sarcoidosis. *J Cutan Pathol* 2004; **31**: 516.
- 8 Sepehri M, Hutton Carlsen K, Serup J. Papulo-nodular reactions in black tattoos as markers of sarcoidosis: study of 92 tattoo reactions from a hospital material. *Dermatology* 2016; **232**: 679–686.
- 9 Bazin D, Daudon M. Some advances in the field of physico-chemical characterization of pathological microcrystals. *Ann Biol Clin* 2015; **73**: 517–534.
- 10 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.
- 11 Colboc H, Bazin D, Moguelet P *et al.* Detection of silica and calcium carbonate deposits in granulomatous areas of skin sarcoidosis by μ Fourier transform infrared spectroscopy and Field Emission Scanning Electron Microscopy coupled with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy analysis. *Comptes Rendus Chim* 2016; **19**: 1631–1641.
- 12 Brisset F. Microscopie Électronique à Balayage et Microanalyses. EDP sciences, Paris, 2012.
- 13 Rafnsson V, Ingimarsson O, Hjalmarsson I, Gunnarsdottir H. Association between exposure to crystalline silica and risk of sarcoidosis. *Occup Environ Med* 1998; **55**: 657–660.
- 14 Kambouchner M, Pirici D, Uhl J-F, Mogoanta L, Valeyre D, Bernaudin J-F. Lymphatic and blood microvasculature organisation in pulmonary sarcoid granulomas. *Eur Respir J* 2011; **37**: 835–840.
- 15 Heffner DK. The cause of sarcoidosis: the Centurial enigma solved. *Ann Diagn Pathol* 2007; **11**: 142–152.
- 16 Walsh NM, Hanly JG, Tremaine R, Murray S. Cutaneous sarcoidosis and foreign bodies. *Am J Dermatopathol* 1993; **15**: 203–207.
- 17 Fingerlin TE, Hamzeh N, Maier LA. Genetics of sarcoidosis. *Clin Chest Med* 2015; **36**: 569–584.
- 18 Schiavo AL, Ruocco E, Gambardella A, O'Leary RE, Gee S. Granulomatous dysimmune reactions (sarcoidosis, granuloma annulare, and others) on differently injured skin areas. *Clin Dermatol* 2014; **32**: 646–653.
- 19 Reid JD, Andersen ME. Calcium oxalate in sarcoid granulomas: with particular reference to the small ovoid body and a note on the finding of dolomite. *Am J Clin Pathol* 1988; **90**: 545–558.
- 20 Berlin JL, Shantha GP, Yeager H, Thomas-Hemak L. Serum vitamin D levels may not reflect tissue-level vitamin D in sarcoidosis. *BMJ Case Rep* 2014; **2014**: 1–4.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Table S1. Patients, histopathology, biology and deposits characterisation in the 14 skin biopsies for cutaneous sarcoidosis.

5) Pathologies associées aux dépôts anormaux en dermatologie : une approche physico-chimique (*article publié dans les Comptes Rendus - Chimie*)

La publication suivante est le fruit d'un travail de synthèse de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse, à la fois sur la caractérisation des dépôts endogènes mais aussi des dépôts exogènes.

Le principe de nombreux outils physico-chimiques y est détaillé, ainsi que la façon dont ils ont été utilisés au cours de mes analyses.



INSTITUT DE FRANCE
Académie des sciences

Comptes Rendus

Chimie

Hester Colboc, Philippe Moguelet, Emmanuel Letavernier, Vincent Frochot, Jean-François Bernaudin, Raphaël Weil, Stéphan Rouzière, Patricia Senet, Claude Bachmeyer, Naomi Laporte, Ivan Lucas, Vincent Descamps, Reyhan Amode, Florence Brunet-Possenti, Nicolas Kluger, Lydia Deschamps, Arnaud Dubois, Solenn Reguer, Andrea Somogyi, Kadda Medjoubi, Matthieu Refregiers, Michel Daudon and Dominique Bazin

Pathologies related to abnormal deposits in dermatology: a physico-chemical approach

Online first, 24th February 2022

<<https://doi.org/10.5802/crchim.153>>

Part of the Special Issue: Microcrystalline pathologies: Clinical issues and nanochemistry

Guest editors: Dominique Bazin (Université Paris-Saclay, CNRS, ICP, France), Michel Daudon, Vincent Frochot, Emmanuel Letavernier and Jean-Philippe Haymann (Sorbonne Université, INSERM, AP-HP, Hôpital Tenon, France)

© Académie des sciences, Paris and the authors, 2022.
Some rights reserved.

 This article is licensed under the
CREATIVE COMMONS ATTRIBUTION 4.0 INTERNATIONAL LICENSE.
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



*Les Comptes Rendus. Chimie sont membres du
Centre Mersenne pour l'édition scientifique ouverte*
www.centre-mersenne.org



Microcrystalline pathologies: Clinical issues and nanochemistry / *Pathologies microcristallines : questions cliniques et nanochimie*

Pathologies related to abnormal deposits in dermatology: a physico-chemical approach

Hester Colboc^{*, a}, Philippe Moguelet^b, Emmanuel Letavernier^{c, d}, Vincent Frochot^{c, d}, Jean-François Bernaudin^{e, f}, Raphaël Weil^g, Stéphan Rouzière^g, Patricia Senet^h, Claude Bachmeyerⁱ, Naomi Laporte^a, Ivan Lucas^j, Vincent Descamps^k, Reyhan Amode^k, Florence Brunet-Possenti^k, Nicolas Kluger^{k, l}, Lydia Deschamps^m, Arnaud Duboisⁿ, Solenn Reguer^o, Andrea Somogyi^o, Kadda Medjoubi^o, Matthieu Refregiers^o, Michel Daudon^{c, d} and Dominique Bazin^p

^a Sorbonne Université, AP-HP, Hôpital Rothschild, Service Plaies et Cicatrisation, Paris, France

^b Sorbonne Université, AP-HP, Hôpital Tenon, Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France

^c Sorbonne Université, AP-HP, Hôpital Tenon, Service d'explorations fonctionnelles, Paris, France

^d INSERM, UMRS 1155, Sorbonne Université, Hôpital Tenon, Paris, France

^e Faculté de médecine Sorbonne Université, Paris, France

^f INSERM UMR 1272 Université Sorbonne Paris-Nord, Bobigny, France

^g Université Paris-Saclay, CNRS, Laboratoire de Physique des Solides, 91405, Orsay, France

^h Sorbonne Université, AP-HP, Hôpital Tenon, Service de Dermatologie, Paris, France

ⁱ Sorbonne Université, AP-HP, Hôpital Tenon, Service de Médecine Interne, Paris, France

^j Sorbonne Université, UMR 8235, Paris, France

^k Service de Dermatologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris, France

^l Department of Dermatology, Allergology and Venereology, Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland

^m Anatomie et Cytologie Pathologiques, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris, France

ⁿ Laboratoire Charles Fabry, CNRS, Institut d'Optique Graduate School, Université Paris-Saclay, Palaiseau, France

^o Synchrotron SOLEIL L'Orme des Merisiers Saint-Aubin, Synchrotron Soleil, Gif-sur-Yvette, France

^p Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie Physique, 91405, Orsay, France

* Corresponding author.

E-mails: hestercolboc@gmail.com (H. Colboc), philippe.moguelet@aphp.fr (P. Moguelet), emmanuel.letavernier@aphp.fr (E. Letavernier), vincent.frochot@aphp.fr (V. Frochot), jf.bernaudin-univ@orange.fr (J.-F. Bernaudin), raphael.weil@u-psud.fr (R. Weil), stephan.rouziere@universite-paris-saclay.fr (S. Rouzière), patricia.senet@aphp.fr (P. Senet), claude.bachmeyer@aphp.fr (C. Bachmeyer), naomijlaporte@gmail.com (N. Laporte), ivan.lucas@upmc.fr (I. Lucas), vincent.descamps@aphp.fr (V. Descamps), reyhan_amode@hotmail.com (R. Amode), florence.brunet-possenti@aphp.fr (F. Brunet-Possenti), nicolaskluger@yahoo.fr (N. Kluger), lydia.deschamps@aphp.fr (L. Deschamps), arnaud.dubois@institutoptique.fr (A. Dubois), solenn.reguer@synchrotron-soleil.fr (S. Reguer), andrea.somogyi@synchrotron-soleil.fr (A. Somogyi), kadda.medjoubi@synchrotron-soleil.fr (K. Medjoubi), matthieu.refregiers@synchrotron-soleil.fr (M. Refregiers), daudonmichel24@gmail.com (M. Daudon), dominique.bazin@universite-paris-saclay.fr (D. Bazin)

Abstract. Although numerous pathologies are associated with abnormal skin deposits, these remain poorly described, as accurate characterization continues to present a challenge for dermatologists. Their submicrometer size as well as their diverse chemistry require various characterization tools. We aim to exemplify characterization of endogenous and exogenous skin deposits in some selected skin diseases using different physico-chemical techniques. We begin with a presentation of selected diseases associated with skin deposits. We then present those of our results which show their variety of structure, location and chemical composition, obtained with various tools: Field Emission Scanning Electron Microscopy coupled with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, X-ray fluorescence, vibrational spectroscopies, as well as techniques specific to synchrotron radiation. Our results constitute a real opportunity to improve diagnosis, and to understand the pathogenesis of many skin diseases, and opportunities for therapeutic intervention.

Keywords. Dermatology, Calcification, Vibrational spectroscopies, Electronic microscopy, Synchrotron radiation.

Online first, 24th February 2022

1. Introduction

A wide variety of diseases produces pathological deposits in tissues, including cancers, genetic disorders, infectious processes and environmental diseases. Such diversity explains the strong interest of the scientific and the medical community in these pathological deposits, as well as the difficulty of establishing a meaningful relationship between their physico-chemistry and the underlying pathology [1–6].

In dermatology, the medical literature reveals the same complexity, and various skin diseases are associated with either endogenous (mineral or organic) or exogenous deposits [7,8]. Mineral endogenous deposits are generally composed of calcium phosphate apatite deposits, and are often considered to be provoked by the skin disease itself [9], while exogenous deposits can present various chemical phases, and are often considered as potential disease causes [10].

Due to their submicrometer size as well as their chemical diversity, characterization of pathological

deposits in the dermis cannot be performed with conventional techniques routinely used in hospital laboratories. Some standard staining procedures such as von Kossa, Yasu or alizarin red, can demonstrate the phospho-calcic nature of the deposits, but they do not provide further information on their chemical composition [11]. It is therefore necessary to develop physico-chemical techniques able to describe their structural characteristics at a micrometre, or even nanometer, scale, as well as their chemical composition [12,13]. Such an approach has been applied successfully to various pathological calcifications in different organs, such as the kidney [14,15], prostate [16,17] or thyroid [18,19].

Various techniques can be used, including Field Emission Scanning Electron Microscopy coupled with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (FE-SEM/EDX) [20–22], μ X-ray fluorescence (XRF) [23–25], μ X-ray scattering [26–29], vibrational spectroscopies: μ Fourier Transform Infra-Red (FTIR) and μ Raman spectroscopies [30–35] as well as techniques

specific to synchrotron radiation [36–39] such as X-ray absorption near edge structure (XANES) [40–45]. These techniques allow the clinician a deeper understanding of the biophysical mechanisms related to the pathogenesis of an abnormal deposit [46], establish a medical diagnosis [47–50] and have a better idea of the effects of drugs on pathological calcifications [51].

The aim of this paper is to present structural and chemical characterisations of both endogenous and exogenous deposits seen in various skin diseases and to discuss the advantages and the limitations of different physico-chemical techniques.

2. Generalities regarding skin calcifications

We will first review definitions related to skin calcification with reference to the literature, after which we will present some recent results using physico-chemical techniques on various skin disease.

2.1. Usual description of disease related to skin calcifications

Skin calcification, also known as calcinosis cutis, has been described for decades, and linked to inflammatory, metabolic, tumoral, genetic and infectious skin diseases [52].

Various authors have proposed classifications of these diseases based on the physiological process leading to the pathological skin calcifications. Four categories are generally recognized: metastatic, dystrophic, idiopathic and iatrogenic calcifications [53], mainly distinguished based on their formation mechanism. The most commonly encountered skin calcifications are metastatic and dystrophic [52].

As Table 1 shows, skin calcifications are not always associated with abnormal calcium and phosphate serum levels. Dystrophic calcifications, for example, are induced by local tissue injury or abnormalities affecting collagen or elastic fibres specifically. Systemic sclerosis [54], lupus erythematosus [55], dermatomyositis [56], or mixed connective tissue diseases, are typical examples of skin pathologies that induce such tissue damage, leading to a calcification nidus. In contrast, metastatic calcifications result from skin calcifications that form on normal tissue adjacent to areas with abnormal calcium and/or phosphate metabolism [53].



Figure 1. Vascular (red arrow) and subcutaneous (green arrow) skin calcifications of the lower limb, in the case of chronic venous insufficiency and leg ulcers.

Some diseases are not easily classified into these categories. Pseudoxanthoma elasticum, for example, is an inherited disease, associated with both a deficit in anti-mineralizing factor (pyrophosphate) and alterations of elastic fibres [57]. The initial phenomenon causing the disease is still disputed, making calcifications observed in pseudoxanthoma elasticum difficult to classify from dystrophic to metastatic calcifications.

Many skin structures can be calcified, especially in the dermis, including vessel walls and dermal interstitium. Figure 1 illustrates the radiological aspects of dystrophic calcifications in chronic venous insufficiency and leg ulcers. Presence of both vascular calcifications, shown by the linear aspect of the deposit, and dermal calcifications, illustrated by a more scattered aspect, are depicted.

While in mammalian epidermis a characteristic calcium gradient exists between lower and up-

Table 1. Types of skin calcifications and related diseases with some of their mechanisms

Type of calcifications	Calcification mechanism	Related diseases
Metastatic	Systemic alteration of calcium phosphate metabolism	Chronic kidney disease Calciophylaxis Hyperparathyroidism Paraneoplastic syndrom Sarcoidosis
Dystrophic	Inflammation/cell death or mineral deposition at sites of tissue damage or alteration of collagen and elastin fibres Serum calcium and phosphate levels are within normal ranges	Connective tissue diseases Scleroderma Lupus erythematosus Dermatomyositis Cutaneous neoplasms Infection Trauma Chronic venous insufficiency Inherited disorders Werner Syndrome Pseudoxanthoma elasticum Ehlers–Danlos syndrome Familial tumoral calcinosis
Idiopathic	No underlying tissue damage or metabolic disorder	Subepidermal calcified nodules
Iatrogenic	Elevated tissue concentration of calcium and tissue damage at the site of extravasated calcium	Intravenous calcium or para-aminosalicylic acid

per layers of the epidermis, little data exists regarding the calcium gradient within the dermis [58–60]. A dermis calcium gradient and its disruption consequent on disease remodelling of skin structures may play a role in skin calcification. However, not all patients with disrupted calcium-phosphate metabolism, nor all patients with local tissue injury, develop skin calcifications. It is probably the consequence of a complex interaction between metabolic disorders and genetic predispositions.

2.2. Diversity of skin calcification localisation and morphology

Latest generation FE-SEM allows a submicrometer scale structural description of these calcified deposits [20–22]. While optical microscopy is limited to a magnification of ca. 1000 (i.e. with a 100× objective and a 10× eyepiece), low voltage electrons can define skin surface topology at magnifications greater than

10,000, constituting a unique opportunity to describe micro calcifications undetected optically.

For our observations, we used a Zeiss SUPRA55-VP SEM, a field-emission “gun” microscope (FE-SEM) operating at 0.5–30 kV. High-resolution observations were obtained using an Everhart-Thornley SE detector. An in-lens SE detector is also available. All the measurements were taken at low voltage (between 0.5 and 2 kV) without the usual carbon deposits at the sample surface. Electron induced X-ray fluorescence experiments are also possible. Five micron tissue slices were deposited on low-e microscope slides (MirrIR, Kevley Technologies, Tienta Sciences, Indianapolis) to enable IR measurements to be performed on the very same sample [13]. Figure 2 shows five skin slices deposited on the low-e microscope slide and positioned in the FE-SEM.

Based on such FE-SEM observations, we identified three different locations where skin calcifications are typically observed: hypodermis, vessel, and der-

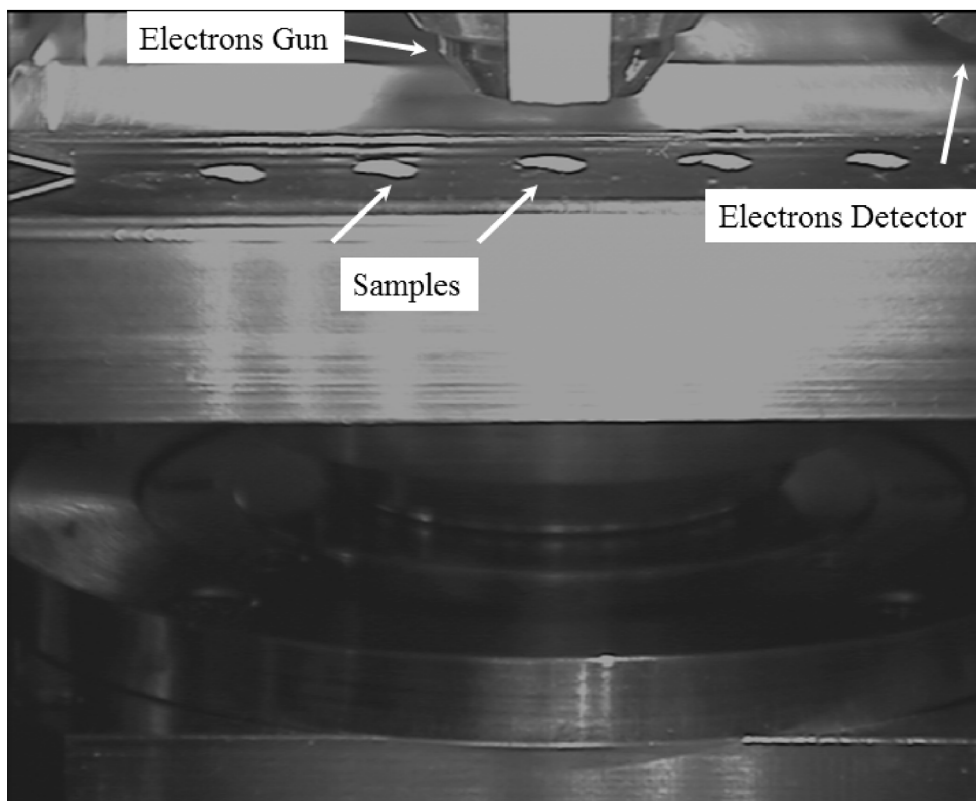


Figure 2. Skin biopsy slices are shown on the low-e microscope slide, positioned in the FE-SEM.

mal fibres (Figure 3). These micrometer scale descriptions constitute a significantly complementary approach to the usual routine hospital radiologic observations shown in Figure 1. Indeed, the spatial resolution of radiological measurements is far inferior [61]; FE-SEM therefore provides unique information regarding the exact location of sub micrometer pathological skin deposits.

FE-SEM also provides information on the morphology of the pathological calcifications. Morphology of skin calcifications varies: in Figure 3A and B calcifications appear as voluminous plaques while on Figures 3C, 4 and 5, high magnification emphasizes sub-micrometre spherical entities.

Calcification size is also very variable. Some are nanometric, making them difficult to identify. For example, in Figure 5 we can see that the calcification size is less than 1 μm .

Regarding the formation mechanisms of the different morphologies of skin calcification, we can hy-

pothesize that the agglomeration of small spherical bodies leads to the formation of a plaque (Figure 6A). A similar mechanism has been identified in ectopic breast calcifications [62] (Figure 6B). These similarities highlight the fact that the pathogenesis of ectopic calcifications can be similar although the tissue and its function may be very different.

2.3. Chemical diversity of skin calcifications

Literature regarding the chemical composition of skin calcifications is scanty. What exists almost consistently reports carbapatite (calcium phosphate apatite) [63–65] as a unique chemical phase in the skin, which was usually the case in the samples we studied. However, our complete set of investigations reveals at least three chemical phases: namely calcite (one of the CaCO_3 polymorphs [66]), amorphous carbonated calcium phosphate (ACCP) and carbapatite (Table 2). More precisely, in both calciphylaxis and arte-

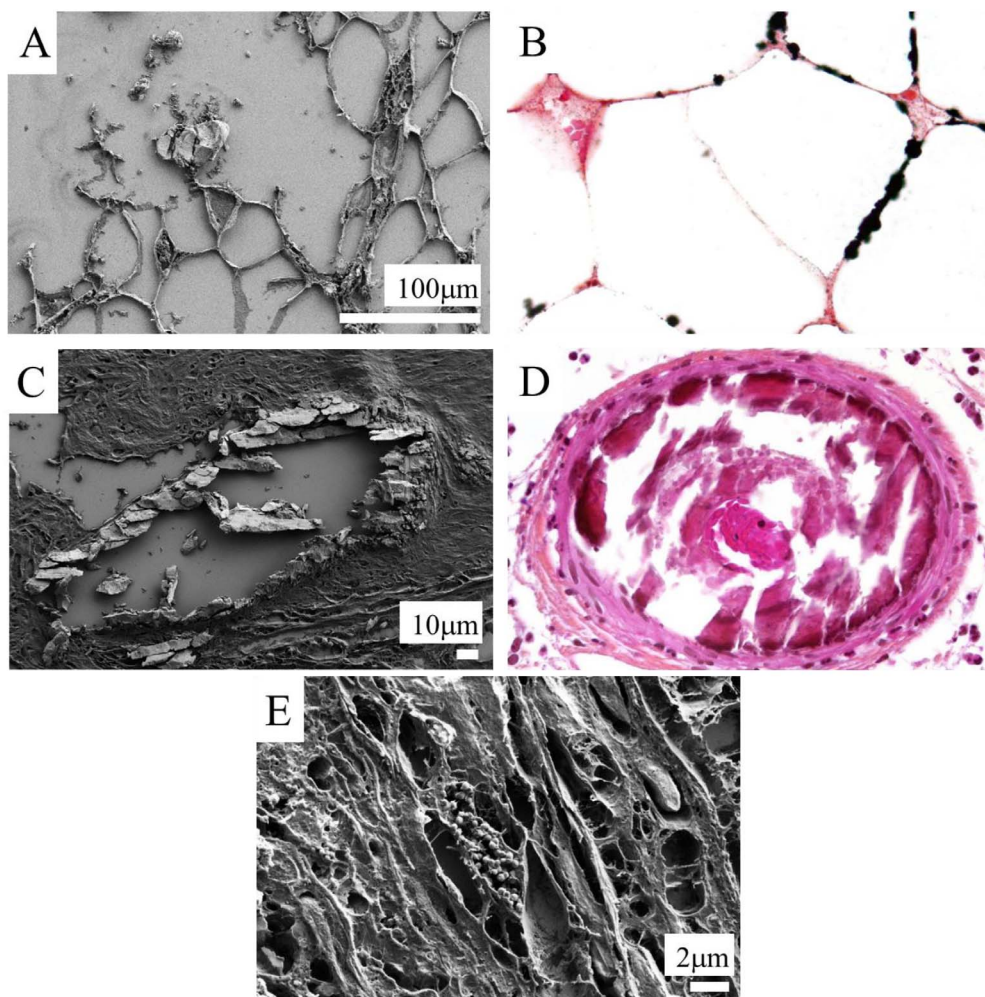


Figure 3. Different skin calcification localisation. Calcification in the hypodermis in cases of calciphylaxis; (A) FE-SEM, (B) Von Kossa-stained $\times 400$. Massive circumferential calcifications of a dermal capillary in cases of calciphylaxis; (C) FE-SEM, (D) HES-stained $\times 400$. (E) Nanometric spherical calcifications in dermal fibers in a case of sarcoidosis, not visible in optical microscopy. FE-SEM.

riosclerosis, we identified carbapatite, while calcium deposits observed in sarcoidosis were composed of calcite. The variety of dermal fibre structural modification associated with different skin diseases may lead to different modifications of skin functions and therefore the formation of different chemical types of calcifications.

Very few studies discuss the chemical diversity of skin calcifications. Among these, a report by Reid and Andersen [67] mentioned the presence of dolomite (not really a true calcium carbonate as its stoichio-

metric formula is $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$). Yet, this chemical diversity has been well described in other organs: different calcium carbonate polymorphs have been identified in pancreatic stones, gallstones, salivary stones, and in the liver [68–71]. A better understanding of the chemical variety of skin calcifications would probably help in understanding the pathophysiology of these skin diseases, as well as the therapeutic options.

Carbapatite and its precursor ACCP represent compounds identified in pathological calcifica-

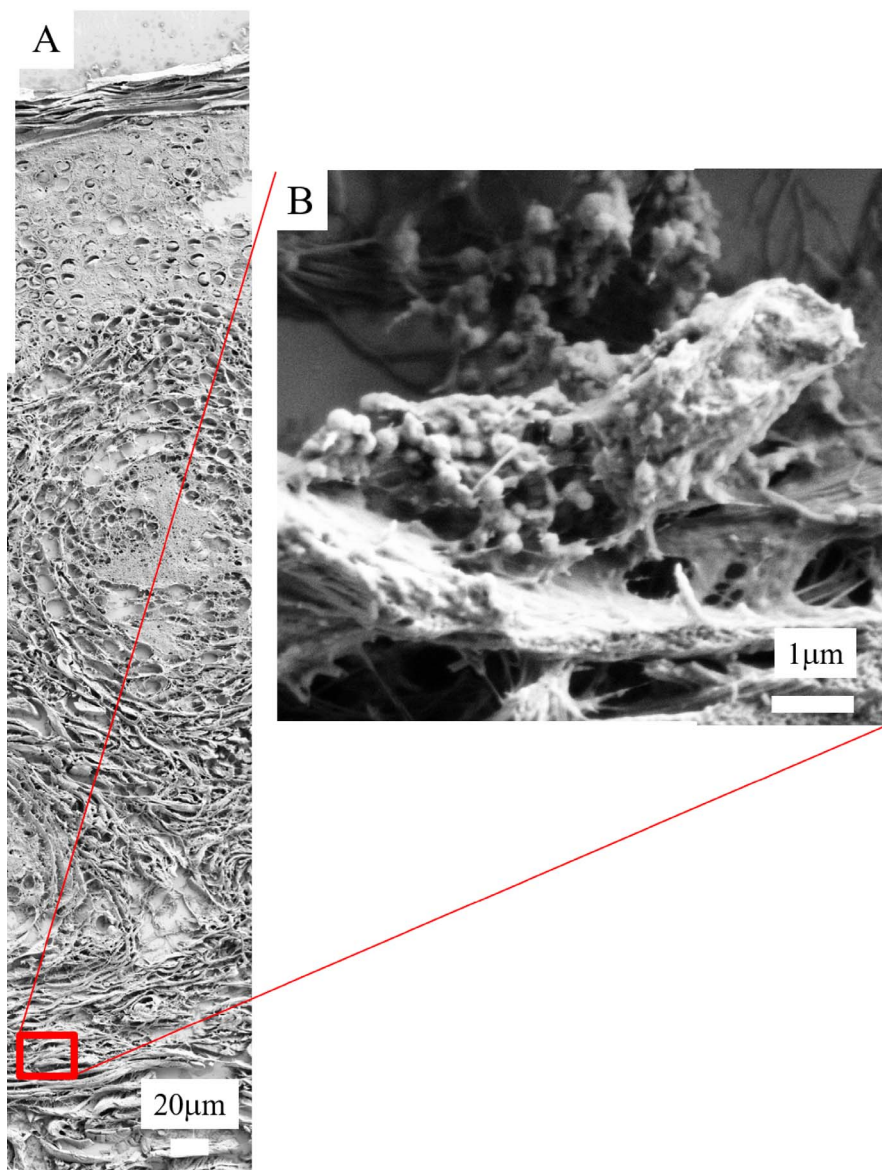


Figure 4. Calcified spherical bodies at the periphery of a granuloma in a sarcoidosis case, observed using FE-SEM.

tions present in kidney, cartilage, thyroid, aortic valve, and breast [72–76]. At this point, it would be useful to summarize some relevant chemical characteristics of carbapatite. Biological apatites correspond to substituted calcium hydroxyapatite (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$) [77–81]. The fundamental structure can tolerate substitutions by other ions with the same or a different charge. Some cations which

can replace Ca^{2+} are Pb^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} or Mg^{2+} . Investigations regarding a possible insertion of these cations in biological apatite have thus been performed [82–84]. Other substitutions involve replacement of the original PO_4^{3-} and OH^- anions which may have the same or a different electric charge (for example F^- substituted for OH^- or CO_3^{2-} substituted for PO_4^{3-} and/or OH^-). This wide range of

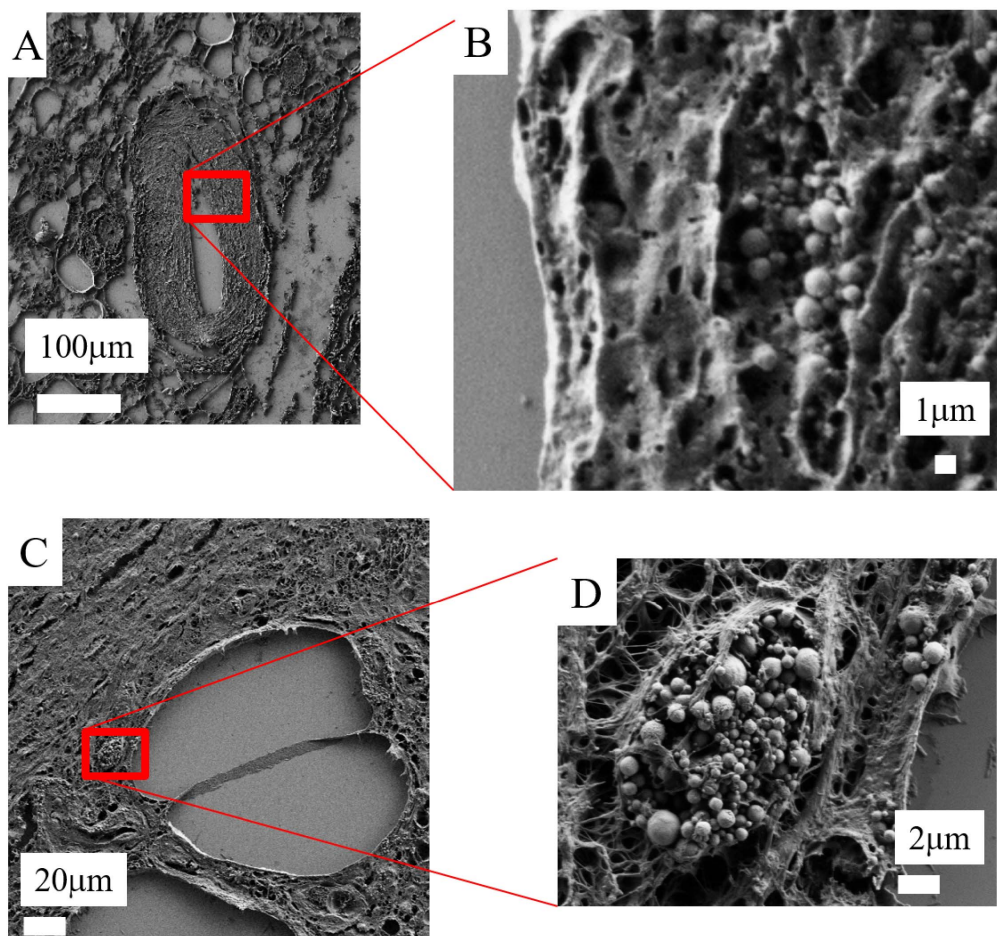


Figure 5. Calcified spherical bodies in a case of calciphylaxis, observed using FE-SEM in the vessel wall (A and B) and on the surface of an adipocyte (C and D).

ion substitutions can modify the physico-chemical and biological properties of apatites.

Numerous studies have been devoted to apatites which are conventionally regarded as conforming to the $A_5(BO_4)_3X$ canonical chemical formula [85,86]. The crystallographic structure (Figure 7) of apatite is well known, the space group is $P6_3/m$ with $a = b = 9.41844 \text{ \AA}$, $c = 6.88374 \text{ \AA}$ [87,88].

The framework of the stoichiometric calcium hydroxyapatite can be described as an assemblage of tetrahedral PO_4 groups [89,90]. An interesting aspect of this is the existence of two channels. The first has a diameter of $2.5 \text{ \AA}$ and is surrounded by Ca^{2+} cations while the second is wider ($3\text{--}4.5 \text{ \AA}$).

Finally, biological apatites display some specific features. One is the widely reported deficiency of

OH^- [91–93]. Another, established more recently, is the presence of hydrogen phosphate (HPO_4^{2-}) ions in PO_4^{3-} sites [94]. Thus, as proposed by Combes *et al.* [80], we report in Table 2 the general formulae for biological apatites.

Regarding physicochemical investigations of biological apatites, it is of major importance to underline that the physicochemical characteristics of calcium phosphate apatite may significantly influence medical diagnostic. For example, in kidney stones, a high carbonate level in calcium phosphate apatite, as well as the presence of amorphous calcium phosphate apatite, indicate an infectious process implying the need for antibiotics [48,95]. The morphology of the kidney stones at the macroscopic scale as well as the morphology of calcium phosphate apatite

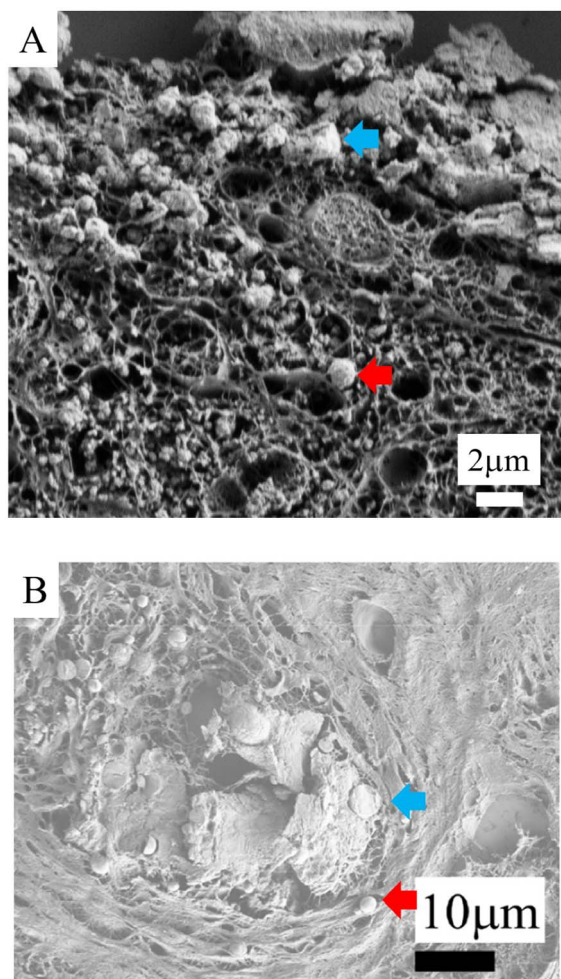


Figure 6. FE-SEM: (A) Agglomeration of spherical bodies (red arrow) leading to the formation of a plaque (blue arrow) in a case of calciphylaxis. (B) Comparison with calcification in a case of breast cancer: agglomeration of spherical bodies (red arrow) leading to the formation of a plaque (blue arrow).

crystallites at the micrometre scale may indicate an inherited distal renal tubular acidosis [49] or primary hyperoxaluria [47,96]. Finally, its zinc content may indicate inflammatory processes [84,97,98].

Another interesting aspect is that calcification morphology at the micrometre scale is not predictive of its chemistry. Spherical calcifications, for example, could be composed of either calcite or carboxylate. The calcification localisation (vascular, dermal

or hypodermal) within the skin tissue again does not correlate with chemical composition, suggesting a relatively modest contribution of the skin tissue environment to the calcifications chemistry.

3. Generalities regarding exogenous skin deposits

The exposome concept was conceived in 2005 to represent the environmental, i.e. non-genetic, drivers of health and disease [99]. The exposome concept takes into account exposure to particles present in food and air or directly in contact with the skin. Skin protects the body from the external environment and it is therefore directly impacted by the exposome.

Penetration of this exogenous material can occur after a trauma, an injection, or a tattoo puncture; they have also been shown to penetrate into the skin through follicular orifices, for example after cosmetic application [100].

There is an increasing interest in understanding the effects of exogenous materials, including nanoparticles, on living tissues, among them skin. Recent developments in nanotechnology have established a link between exogenous deposits and some inflammatory diseases, such as in sarcoidosis [101, 102], frontal fibrosing alopecia [103,104] and tattoos [105,106].

4. Physico-chemical characteristics of deposits in various skin diseases

4.1. Calciphylaxis

Calciphylaxis is a disease with high morbidity. It affects up to 4% of patients with end stage renal disease, and its incidence rate increases for those on chronic hemodialysis [107]. Calciphylaxis is unlikely for patients with normal renal function.

The significant morbidity and mortality of calciphylaxis results from extensive skin necrosis, septic complications, and organ failure, which are the direct consequences of these ectopic calcifications. Female sex, diabetes mellitus, high body mass index, elevated calcium, phosphorus, and parathyroid hormone serum levels, nutritional status, and cinacalcet or vitamin K antagonist treatments, are associated with an increased risk of developing the disease [108,109].

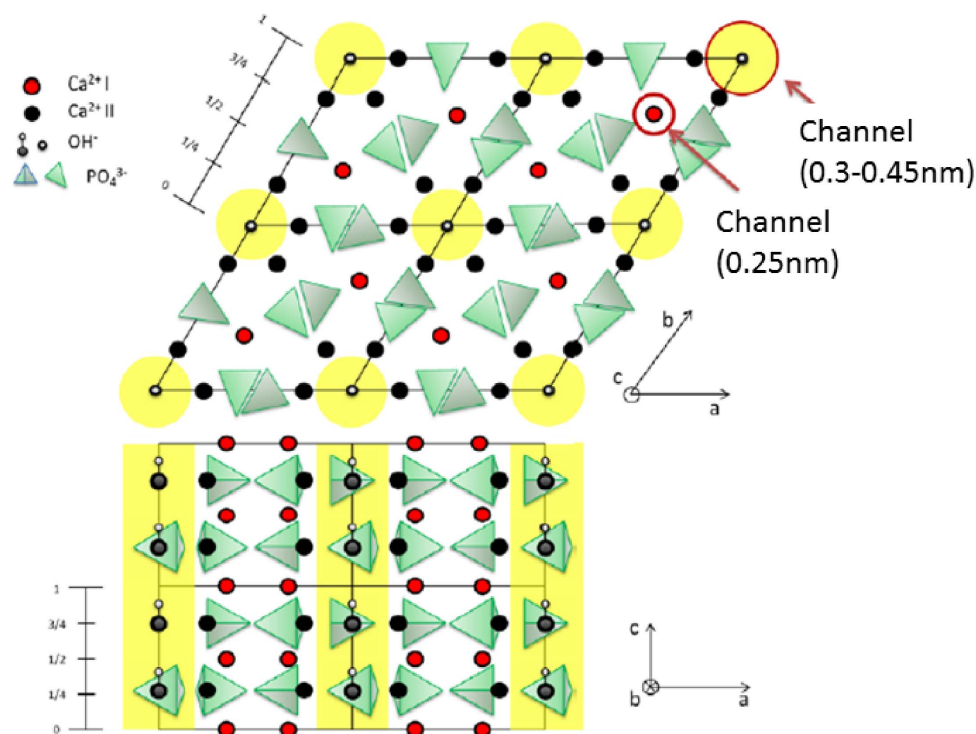


Figure 7. Crystallographic structure of the apatite 001 (top) and 010 (bottom) planes (from Ref. [77]).

Table 2. Different calcium phosphate compounds with their stoichiometry and their Ca/P ratio

Skin diseases	Serum calcium and phosphate levels	Calcifications' localisation	Chemical phase	Stoichiometry
Calciophylaxis	Usually elevated	Vessels, dermis, hypodermis	Amorphous carbonated calcium phosphate (ACCP)	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6 \cdot n\text{H}_2\text{O}$
Calciophylaxis	Usually elevated	Vessels, dermis, hypodermis	Carbapatite	$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4^{2-} \text{ or } \text{CO}_3^{2-})_x(\text{OH})_{2-x}$ with $0 \leq x \leq 2$
Sarcoidosis	Usually normal	Dermis (surrounding granulomas)	Calcite	CaCO_3

Treatments usually achieve poor outcomes. They include calcimimetics, surgical parathyroidectomy, sodium thiosulfate, and bisphosphonates [110–112]. Pathogenesis of the disease is still under debate. Calcifications observed in calciophylaxis are considered to be metastatic calcifications, as they occur in patients with a phospho-calcic metabolic disturbance [52,53]. However, some authors also suspect that metalloproteinase digestion of elastin

might occur in calciophylaxis, enhancing deposition of calcium within these modified elastic fibres [113]. In this hypothesis, calcium deposits in calciophylaxis could also be considered as dystrophic calcifications. Other authors suspect that metal deposits in the skin tissue are a trigger for a phenotypic switch of vascular smooth muscle cells from a contractile to an osteogenic phenotype [114].

Recently, we have combined FE-SEM observa-

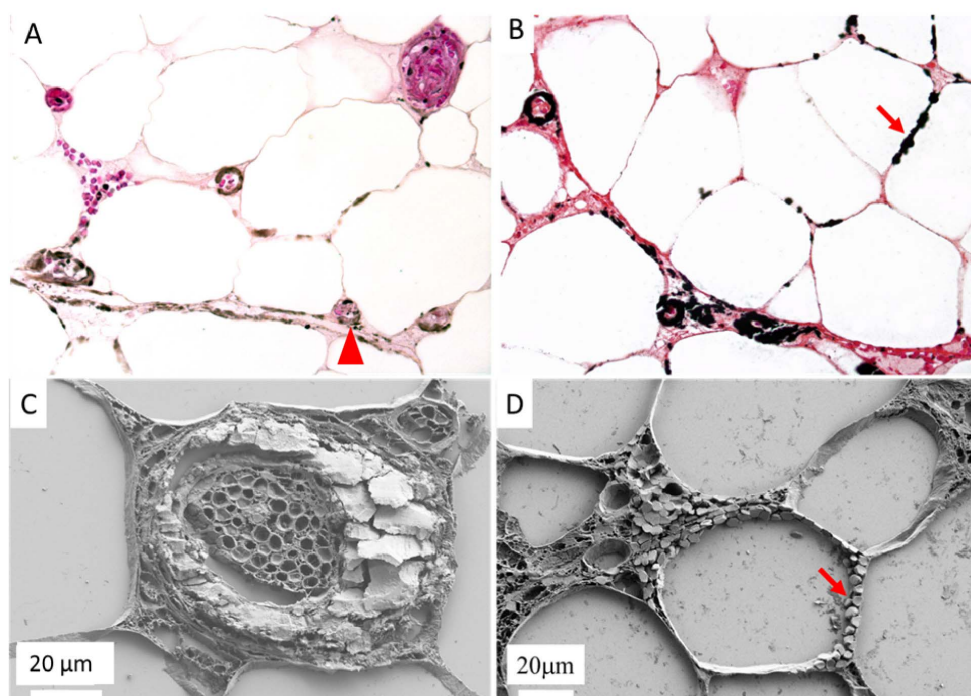


Figure 8. Optical microscopy and FE-SEM comparisons in calciphylaxis. Optical microscopy showing multiple calcifications along adipocytes and in vessels walls, (A) Hypodermis, arrow head: calcified vessel, HES $\times 400$, (B) Hypodermis, arrow: calcifications along adipocytes, Von Kossa $\times 400$. FE-SEM: (C) Massively calcified vessel, (D) Calcifications along adipocytes.

tions of calcic skin deposits in calciphylaxis with FT-IR and Raman spectroscopic chemical analysis, and compared these results to calcifications observed in arteriosclerosis [63]. We showed that calcifications in calciphylaxis are composed of carbapatite, always located circumferentially, mostly in the intima of otherwise normal-looking vessels and often associated with interstitial deposits (Figure 8). Although vascular calcifications in arteriosclerosis were also composed of carbapatite, they are associated with medial hypertrophy, localized to parts of the vessel, and not associated with interstitial deposits. These results suggest a different pathogenesis and provide new insights into calciphylaxis pathogenesis that could explain the poor outcomes of vasodilators compared with the relative effectiveness of calcium-solubilising-drugs.

4.2. *Sarcoidosis: cases of exogeneous and endogenous abnormal deposits*

Sarcoidosis or Besnier-Boeck-Schaumann disease [115] is a chronic, multiorgan inflammatory disorder. The disease onset peaks during the third and fourth decades of life, and has a higher incidence among women and in Afro-American patients [116,117]. If the lungs are affected, in the vast majority of diagnosed patients other organ systems are often affected as well [118,119]. According to literature [120], skin is the second most affected organ, and may be involved in 25% to 30% of cases. Cutaneous sarcoidosis preferentially affects sites of prior injury such as tattoos [121,122] and scars [123].

Although clinical phenotypes, particularly of cutaneous lesions, are widely variable, the hallmarks of sarcoidosis are always noncaseating epithelioid and giant cell granulomas. The granulomatous inflammation (Figure 9) observed in sarcoidosis is considered to be caused by a complex interaction between

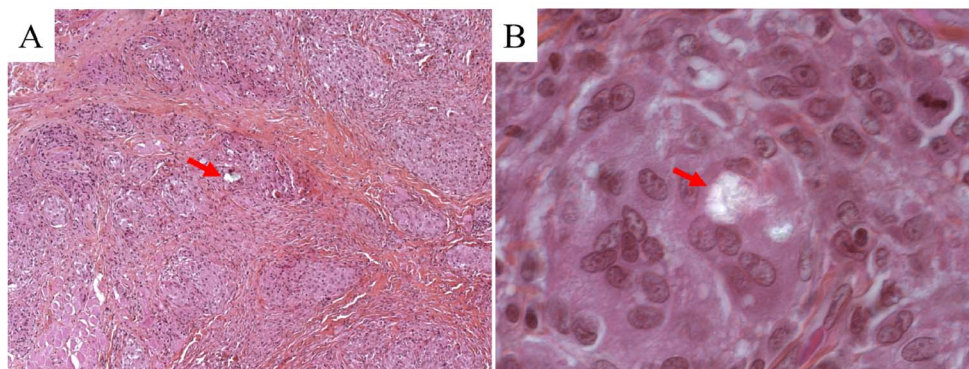


Figure 9. Optical microscopy and polarized light examination of granulomas in skin sarcoidosis, showing birefringent particles (arrow): (A) HES $\times 100$, (B) HES $\times 400$.

genetic background, environmental agents, infectious antigens, and T lymphocyte driven immune reactions [124].

Sarcoidosis, as well as being observed in other granulomatous diseases, is associated with calcium metabolism disorders. High serum calcium levels are seen in 5 to 10% of patients, mainly due to dysregulated production of calcitriol by activated macrophages which form the granulomatous lesions. These metabolic disturbances may lead to calcium deposits in various organs, including the skin, causing metastatic calcifications [125]. Reid and Andersen have indeed reported the presence of calcium oxalate and phosphate deposits in sarcoidosis involving lymph nodes and lungs [67]. Even though these chemical analyses have been done in different organs, they have never been performed in skin sarcoidosis.

Exact causes of the disease are still unknown; however the role of environmental mineral particles is highly suspected on epidemiological grounds [126]. There is a polarizable material in the centre of some granulomas, suggesting that foreign materials could be a nidus for granuloma formation and a potential trigger for the disease [127–130]. Using biopsy specimens of granulomatous lesions from 50 patients, Kim *et al.* [131] have estimated the frequency of polarizable foreign bodies in cutaneous lesions of sarcoidosis. These authors noticed that polarizable foreign bodies were present in the granulomatous skin lesions of 12 of 50 patients (24%) with cutaneous sarcoidosis. Using electron probe microanalysis, they identified the following elements: Calcium, phos-

phorus, silicon, and aluminium. Unfortunately, such a characterization technique is not able to identify the compounds in which these elements occur.

Electron microscopy has been used in several previous investigations [114–118]. For example, Take-mura *et al.* [132] clearly demonstrated that ultra-structural examination improves the diagnostic utility of endomyocardial biopsy in cardiac sarcoidosis, by clearly identifying even only one epithelioid cell. More recently, Kuribayashi *et al.* [133] showed by electron microscopy that multinuclear giant cells were formed by epithelioid histiocytes and an aggregation of lymphocytes. Interesting FE-SEM results by Catinon *et al.* [134] indicate the presence of calcium phosphate particles in 7 out of 10 patients.

Recently, we have investigated 14 skin biopsies from cutaneous sarcoidosis patients by FE-SEM/EDX and FTIR spectroscopy [135,136]. FE-SEM allowed the identification in three patients of silica in the centre of skin granulomas (Figure 10). Some FE-SEM apparatus are able to acquire X-ray fluorescence spectra [20–22] so it is possible to know the elementary composition of specific materials in the tissue. Note that this selection can be performed at the sub-micrometer scale when electrons are employed as probes.

Figure 10E displays the X-ray fluorescence spectra induced by the primary electrons of the microscope on the foreign material we identified, and we can clearly see the contributions of Si ($K_{\alpha} = 1.740$ keV) and the contributions of other elements in the support (Zn, $L_{\alpha 1} = 1011.7$ keV; Ag, $L_{\alpha 1} = 2.984$ keV).

To determine the chemical nature of the foreign

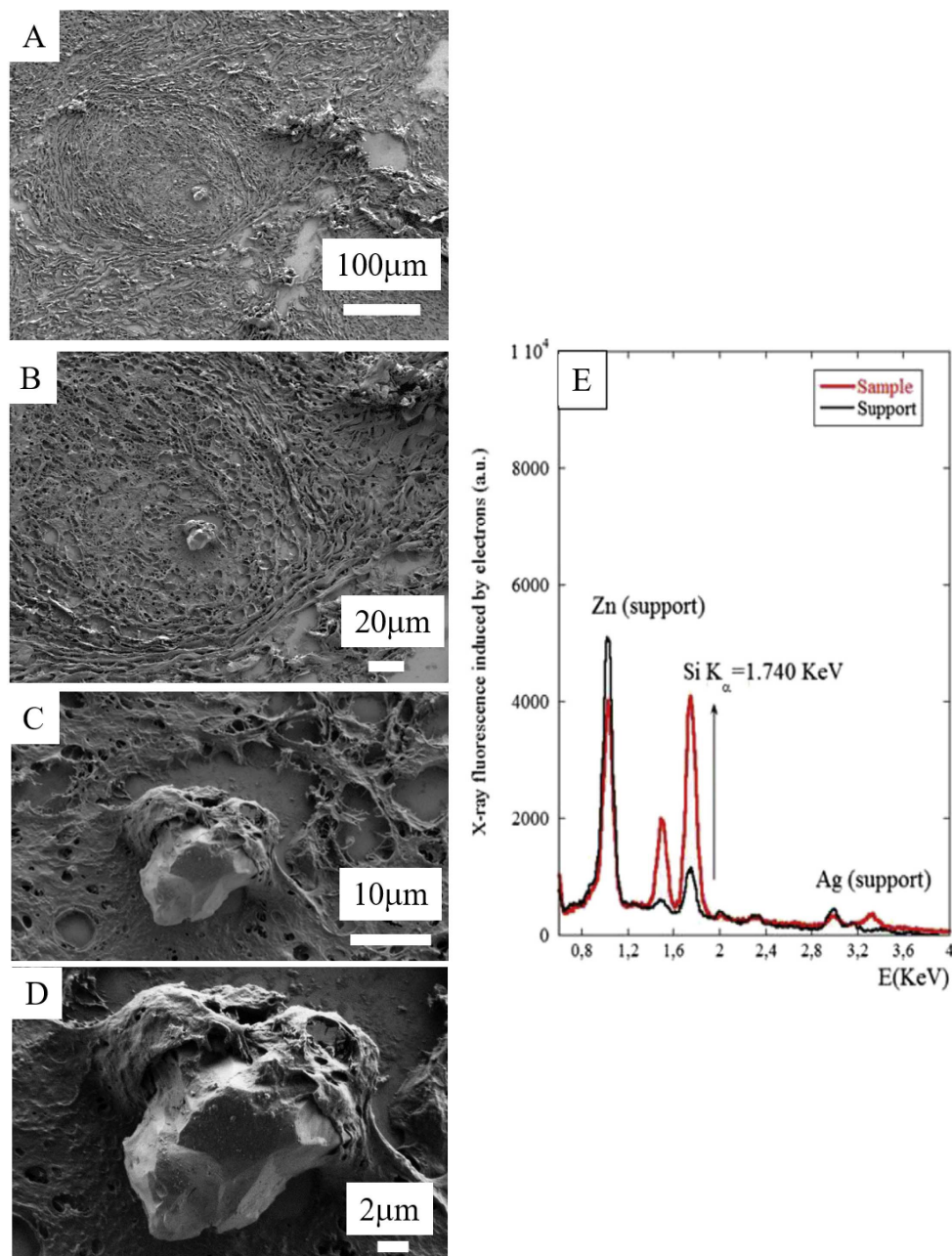


Figure 10. (A–D) FE-SEM photographs of foreign material in the skin biopsy of the arm of a patient with cutaneous sarcoidosis. (E) EDX spectrum identifies silica in the abnormal deposit at the centre of the granuloma.

material precisely, FTIR data have been collected on the same sample. Infrared spectroscopy is an advantageous, non-destructive, and label-free technique for chemical analysis of biological tissues (Fig-

ure 11) [137–139]. This spectroscopy detects vibrational energy levels and phonons of materials and leads to precise chemical and structural information

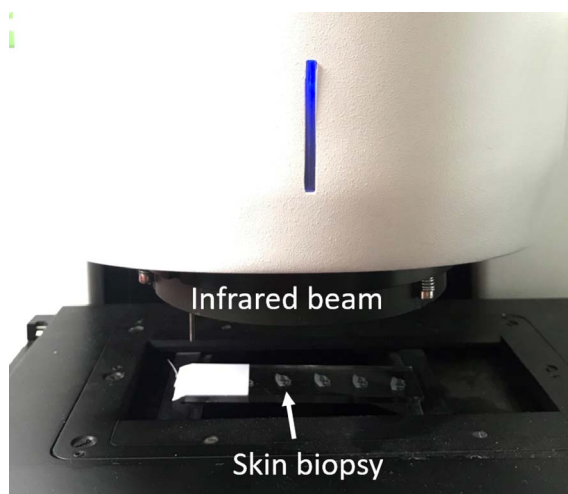


Figure 11. Slices from a skin biopsy are visible on the low-e microscope slide, which is positioned in the FTIR spectrometer.

by comparison with data bank reference spectra [30].

It is convenient to conceptualize an IR spectrum as two regions: 4000–1000 cm^{-1} known as the functional group region, and <1000 cm^{-1} known as the fingerprint region, even if for many chemists the dividing line is in fact 1450 cm^{-1} . The functional group region contains relatively few peaks, which are typically associated with the stretching vibrations of functional groups. In the fingerprint region, the spectra usually consist of bending vibrations within the molecule. This region is the key to the data analysis because it is here that each distinct compound produces its own unique pattern of peaks, effectively a fingerprint [140–143].

A large number of investigations are based on another vibrational spectroscopy, namely Raman [33–35]. As emphasized by Khulbe and Matsuura [144, 145], infrared and Raman spectra of a given molecule complement each other. The symmetrical stretching, ν_1 (normal vibration) of CO_2 is infrared inactive, but active in Raman. On the contrary, the bending, ν_2 , and asymmetric stretching, ν_3 , vibrations are Raman inactive and infrared active.

These differences arise from the fact that infrared spectroscopy exploits an absorption process dependent on the permanent dipolar moment of a molecular bond, while Raman spectroscopy is a scattering process related to a modification of the polarizability (induced change of the dipolar moment) of the molecule.

Recently, Krafft *et al.* [146] have compared these two spectroscopies in colon tissue applications. These authors note that the advantages of FTIR imaging are related to shorter acquisition times and higher spectral quality, while Raman imaging displays better spatial and spectral resolution. Also, significant differences also exist with respect to the preparation of biological tissue samples.

In Figure 12, the infrared bands show clearly that the foreign material is composed of crystalline silica [135], a chemical characteristic clearly indicating an exogenous origin of this abnormal deposit.

As we have seen previously, FE-SEM also offers the possibility of precisely describing skin deposits. For two of the samples, we have been able to pinpoint nanometer scale spherical bodies between the collagen fibres not detectable by classical optical microscopy. To determine their chemical composition (Figure 13A), we performed FTIR spectroscopy (Figure 13B) as well as EDX measurements (Figure 13C). Based on specific IR absorption bands, we can conclude that the spherical entities are calcite. On EDX analysis, we noticed the absence of a fluorescent P signal (2.01 keV) and the presence of a significant signal related to Ca (3.7 keV) in line with the FTIR spectrum showing the presence of calcite.

Another striking result of this investigation was the identification of spherical calcite entities in the periphery of the granuloma in 4 patients. This is in line with the fact that sarcoidosis, as well as observed

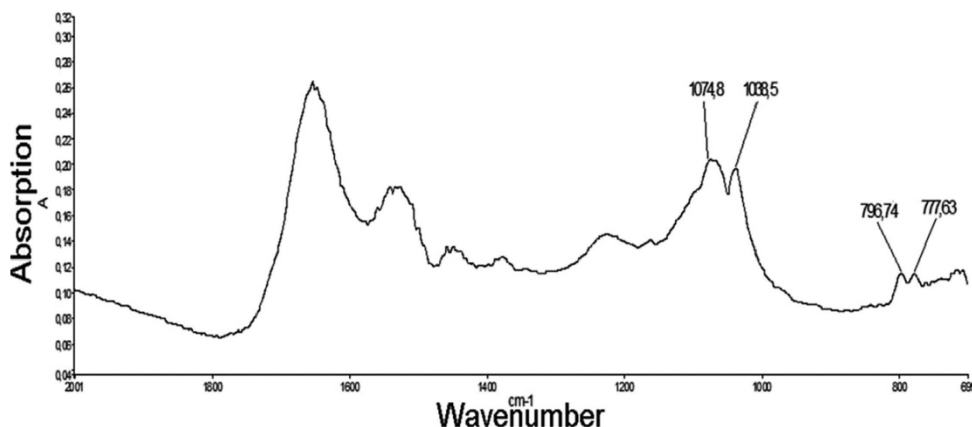


Figure 12. Infrared spectrum of the foreign material. The absorption bands at 1074 and 1038 cm^{-1} are associated with crystalline silica. Also, we can clearly see the α -quartz doublet (Silica) around 800 cm^{-1} in accordance with established infrared spectrometric data [30].

in other granulomatous diseases, is associated with calcium metabolism disorders [146,147].

Based on the entirety of our data, sarcoidosis exemplifies a case where both endogenous and an exogenous pathological deposit can be identified. Note that the presence of the nanometer scale endogenous calcifications cannot be discerned through classic staining procedures. This specific chemical composition observed only in sarcoidosis may be due to the significant dermal structure modification observed in the disease, which modifies the physiological spatial distribution of calcium through granuloma driven skin restructuring. A well-developed sarcoid granuloma consists of a tightly packed conglomerate of epithelioid- and multinucleated-giant cells encircled by lymphocytes, especially CD4+ T helper cells, but also rare CD8+ T cells and B cells [147–149]. Such reorganisation may lead to a specific calcification pathogenesis in sarcoidosis, explaining the presence of calcite and not carbapatite.

4.3. Tattoo-associated keratoacanthoma

Tattooing involves introducing pigmented material into the dermis by puncturing the skin, in order to obtain a permanent design. It is a very old practice, which has probably been performed since the Neolithic times [150]. Nowadays, tattoos are very widespread: in Europe, there are around 100 million people with tattoos [151,152]. Tattoo inks are made of almost insoluble pigments mixed with additives such

as formulants, dispersants, and preservatives [153, 154]. Nowadays, natural pigments are very rarely used, and most tattoo inks are composed of synthetic substances [155–160], allowing cheaper mass production of inks with a large variety of shades. The composition of tattoo inks is poorly regulated worldwide, including in Europe, with few recent guidelines [161,162]. Various types of carcinogenic compounds occur in tattoo inks, including primary aromatic amines (PAA), cleavage products of organic azo colourants used in the inks [163]. Tattoos therefore effectively present permanent lifelong exposure to potentially carcinogenic compounds [164,165]. Many cases of skin cancers occurring within tattoos have been reported, including cases of keratoacanthoma (KA) on red ink, and the role of PAA is suspected [166,167]. Furthermore, cases of multiple or recurrent KA on tattoos have been reported, making the causality link between these skin tumours and tattoos even stronger [168].

Recently, we published an investigation regarding the chemical composition and distribution of tattoo inks within tattoo associated KA [169]. Clinical and histopathological data from three patients coming from Bichat Hospital diagnosed with tattoo associated KA in 2017 were selected (Figure 14). The medical file was completed by structural and chemical characterisation of tattoo inks within KA.

Regarding laboratory characterization techniques, we used X-ray fluorescence (XRF) [23–25] to identify the inorganic elements and Raman spec-

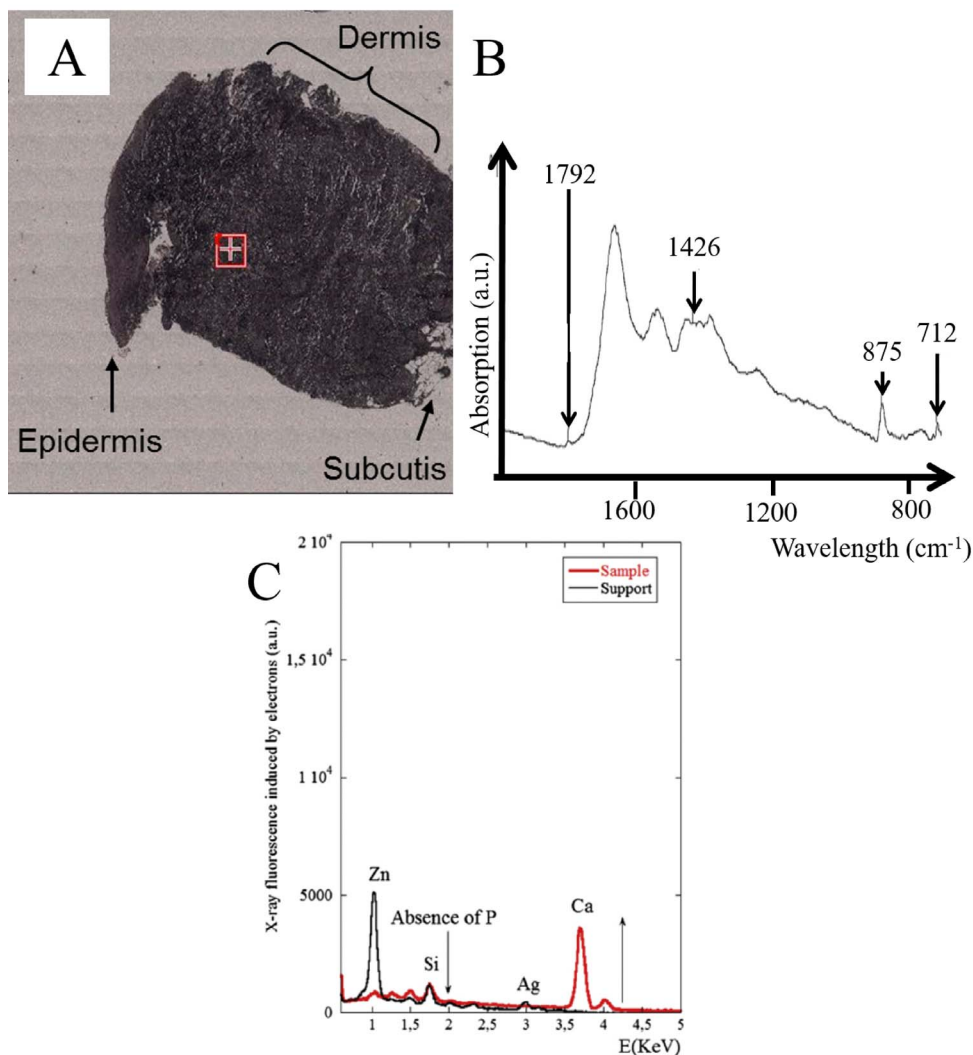


Figure 13. (A) Optical photograph of skin sarcoidosis; (B) Infrared spectrum of the peaks characteristic of calcite (1087 cm^{-1} (weak), 881 cm^{-1} , 1432 cm^{-1} , 712 cm^{-1}) in a protein matrix, from the area corresponding to the red square on the map, located in the dermis. (C) Electron induced X-ray fluorescence of the sample. The contributions of trace elements from the support, namely Zn (1.01 keV), Si (1.74 keV) and Ag (2.98 keV), are clearly visible.

troscopy to identify the organic compounds present in tattoo inks [170–173]. As we can see in Figure 15, the sensitivity of laboratory XRF is sufficient to show the presence of various elements in a skin biopsy. The micrometre resolution of Raman spectroscopy enabled the identification of an organic compound, namely the Pigment Red 170 (PR170) dye, as well as agglomerates of TiO_2 nanoparticles (Figure 16). Even though it is usually possible to define the chemical

nature of iron oxide [174,175], this approach was not possible with our sample, probably due to a lack of sensitivity.

Like other researchers working on tattoos [176, 177], we also used synchrotron characterization techniques, specifically XANES spectroscopy where acquisition at the iron K edges (Figure 17) defines the iron environment.

While Ti always has an exogenous origin, iron and

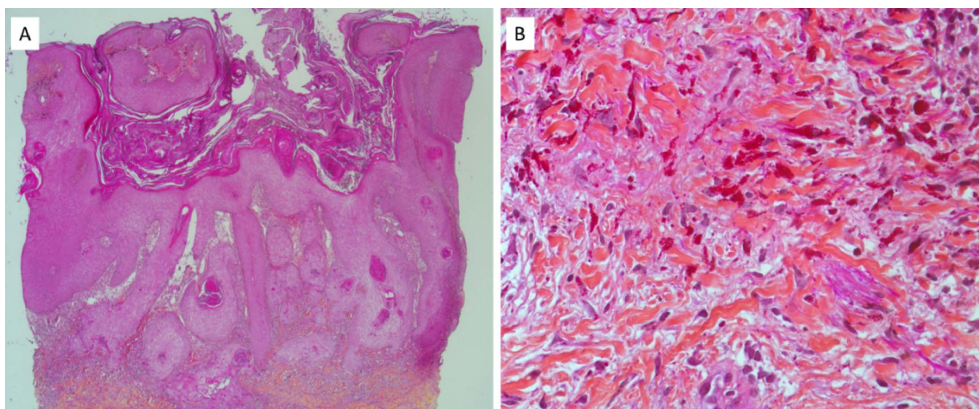


Figure 14. Optical microscopy of a KA developed on a tattoo made of red ink, from one of the three patients previously described. (A) HES $\times 25$. (B) Superficial dermis, HES $\times 400$.

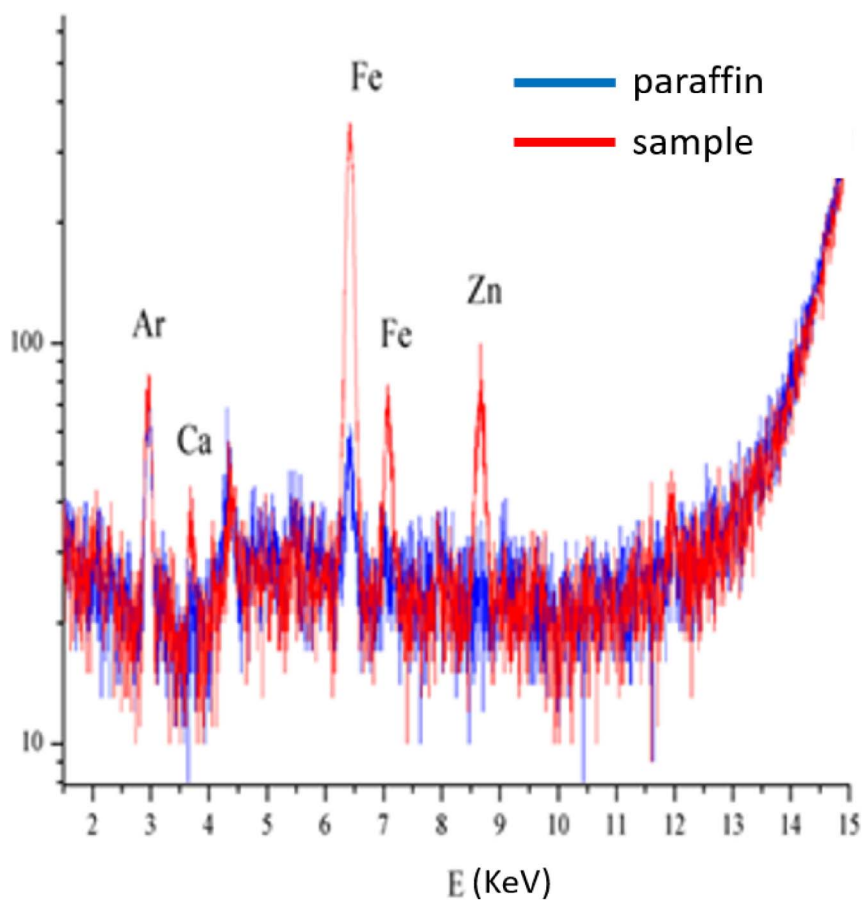


Figure 15. Laboratory XRF spectra of skin reaction to a tattoo. The sample contains high levels of iron and zinc which may be of exogenous or endogenous origin.

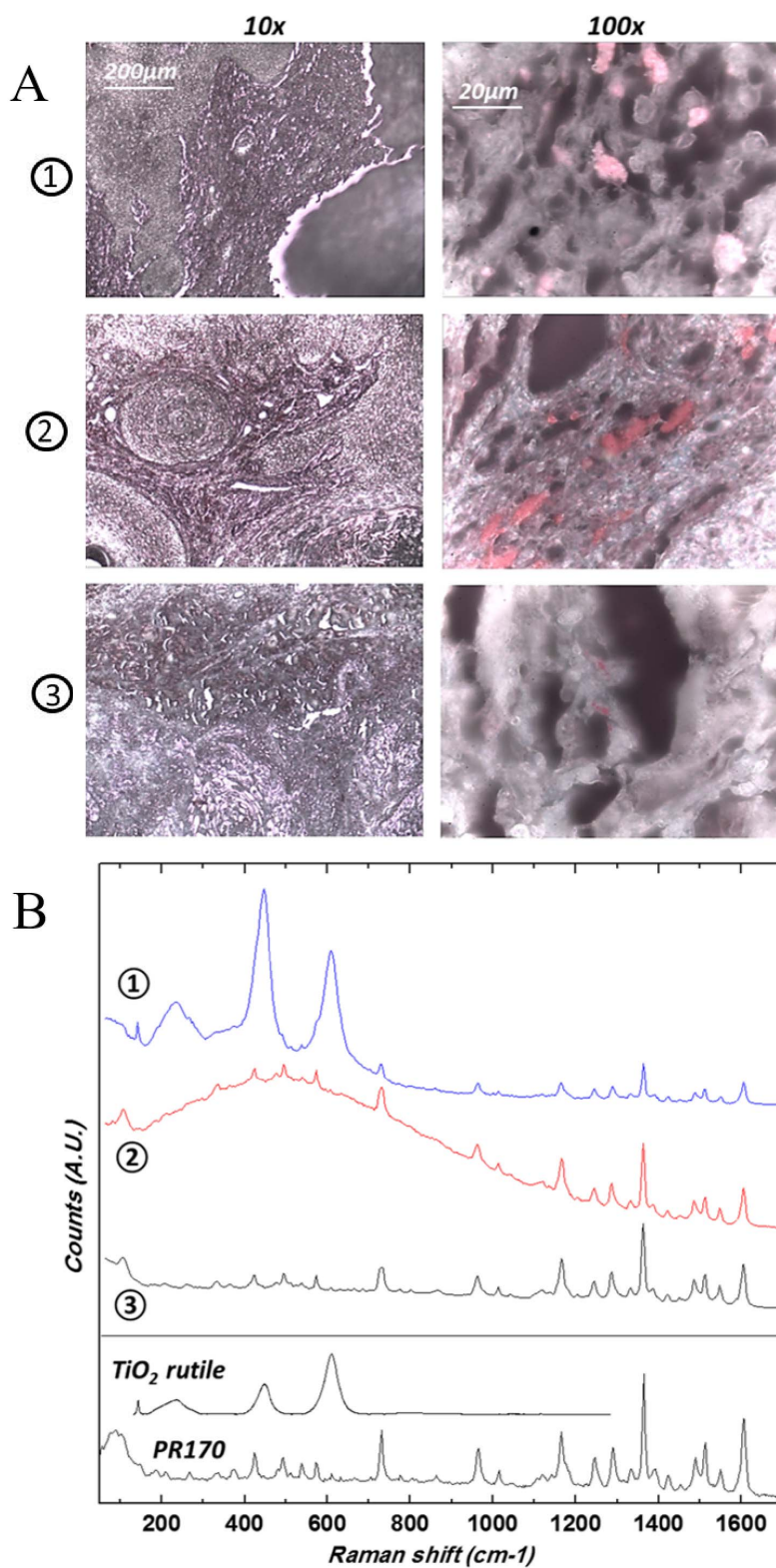


Figure 16. Caption continued on next page.

Figure 16 (cont.). (A) Optical micrographs of the samples of the three patients previously described, at two different magnifications (10× and 100×) revealing micron size red pigment clusters. In patient 1, note the heterogenous and lighter aspect of the red pigment, suggesting the presence of nanoparticles of TiO₂. (B) Corresponding Raman spectra. Reference spectra are also given as a comparison: PR170 dye sample (Kremer) and rutile (TiO₂) downloaded from the RRUFF database.

Table 3. Synthetic iron oxide (found in pigments)

Name	Formula	Colour
Hematite	Fe ₂ O ₃	Red
Magnetite	Fe ₃ O ₄	Black
Goethite	FeO(OH)	Yellow
Limonite	Fe ₂ O ₃ H ₂ O	Brown

Table 4. Synthetic compounds used as pigments

Colour	Ingredients
Black	Magnetite
Red	Iron oxide/common rust, ferric sulfate, hematite,
Green	Ferrocyanide and ferro-ferric cyanide,
Blue	Ferric ferrocyanide

zinc can be either exogenous or endogenous. XANES spectroscopy can be used to chemically characterize these elements; for example, in the case of iron, XANES spectra of human adult deoxyhaemoglobin and myoglobin have been measured [178]. For exogenous iron, among the different compounds which have been identified in pigments, H. Petersen and D. Lewe noticed the presence of the following oxides: Fe₂O₃, FeO(OH) and Fe₃O₄ [176]. Table 3 summarizes synthetic iron oxides used as pigments [179]. Islam *et al.* [180] reported other chemical compounds containing iron (Table 4). As we can see, ferric sulfate, ferric ferrocyanide (the anion [Fe(CN)₆]^{4−}) and ferri-cyanide (the anion [Fe(CN)₆]^{−3}) may be also present. Most of the particles used in pigments can be considered to be nanomaterials [181].

Other elements in tattoo ink are associated with the iron or titanium. For example, as underlined by Prior [153,154], all iron oxide pigments contain minor amounts of nickel impurities, even when iron oxide pigments are refined to a high degree of purity. The

fact that nickel incorporates into the crystal structure constitutes a health risk of possible allergic reactions [153,154].

Figure 17 shows the spatial repartition of iron in a KA developed on tattoo ink. When we compare the experimental Xanes spectra of the selected POI with that of goethite, it is quite clear that this compound has been used.

4.4. Frontal fibrosing alopecia

Fibrosing frontal alopecia (FFA) was first described 20 years ago. It is characterized by scarring alopecia on the anterior area of the scalp and mainly affects women after menopause [182]. Its origin is unknown, but as the number of cases continues to increase, it is suspected that extraneous compounds found in leave-on facial skin care products are implicated [183]. TiO₂ is the most widely used white pigment. It is found in a very large number of products: paints, construction materials, food (candies, cookies, etc.), pharmaceuticals (capsule shell, toothpaste, etc.) but also in cosmetics: creams and sunscreens, due to the UV blocking properties of TiO₂. The potential toxicity of TiO₂ is currently a major public health concern—TiO₂ has been classified in group 2B (“possibly carcinogenic to humans”) by the International Agency for Research on Cancer; the long-term dermatological impact of these particles is not yet well known in humans. It is still debated whether TiO₂ penetrates the stratum corneum, but it has been clearly demonstrated that it can be deposited in the follicular orifice [184].

In a previous publication, we reported finding titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles along the hair follicles of a patient with FFA, who had been using daily sunscreens containing TiO₂ for years [104]. The analyses were carried out by electron microscopy, and by X-ray fluorescence spectroscopy at the Nanoscopium beamline (Figure 18). First, a search for nanoparticles was carried out by scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray absorption

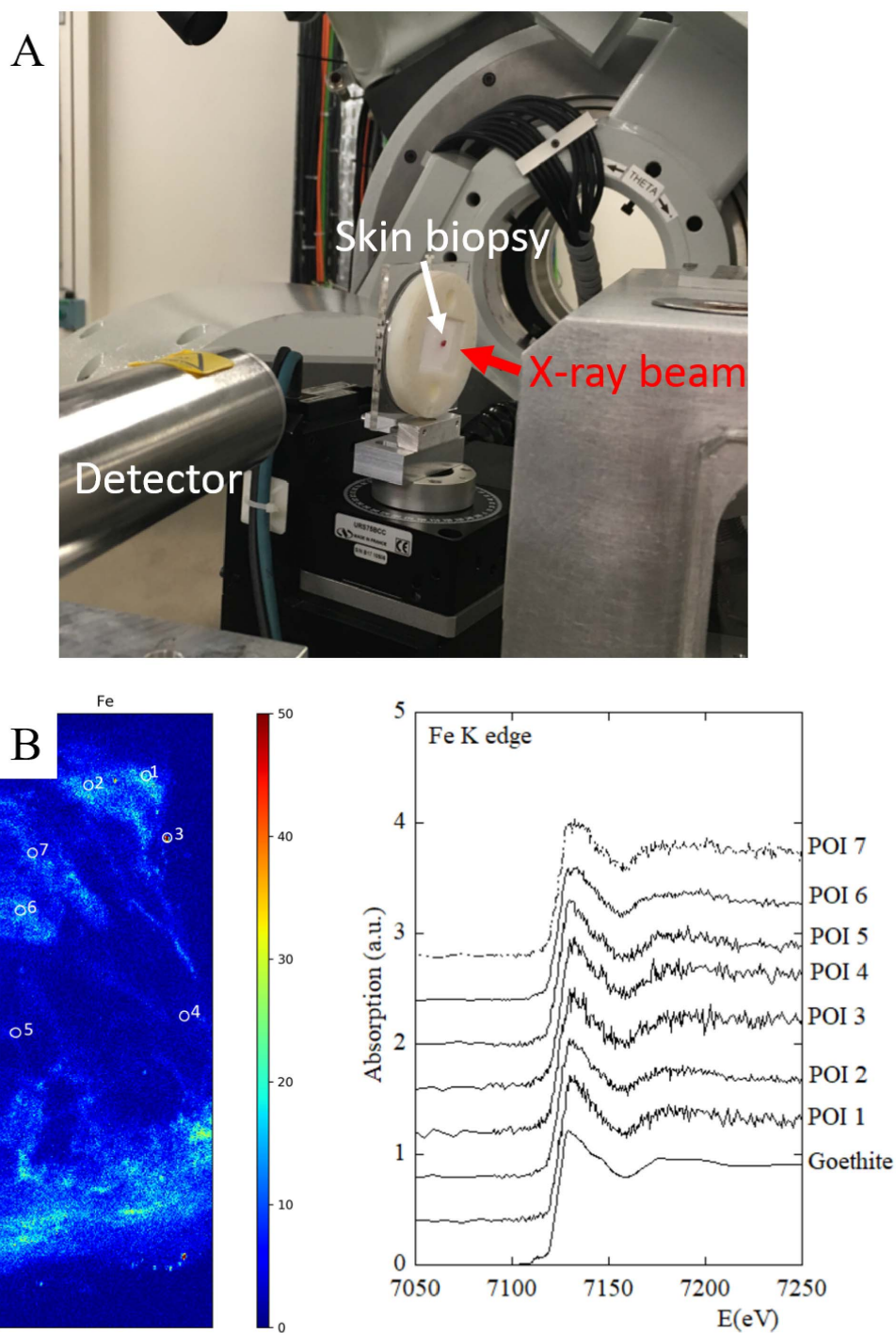


Figure 17. (A) Xanes spectroscopy set-up at Synchrotron Soleil, Diffabs beam line. (B) XANES spectroscopy at the Fe K-edge: XANES spectra at Fe K-edge were acquired at 7 points of interest (POI) in order to characterize the Fe environment.

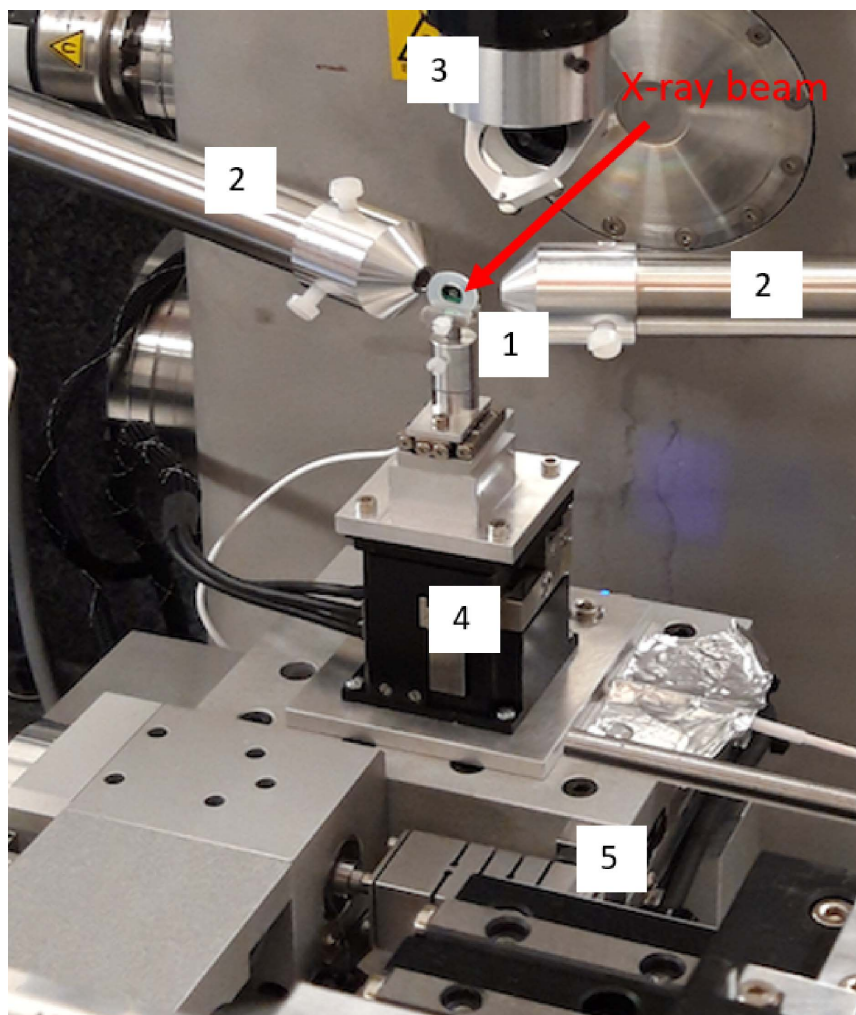


Figure 18. Nanoscopia set up. 1: Sample. 2: X-Ray fluorescence detectors. 3: Visible microscope for sample alignment. 4: Nanopositioning for high spatial resolution. 5: Stepper motors for large field of view.

spectroscopy. Abnormal deposits, micrometric in size, were observed along the hair and their analysis revealed that they contained titanium.

To refine these results, the deposits were studied on the Nanoscopia beamline of the Synchrotron Soleil by fluorescence spectroscopy using an X-ray nanobeam ($300 \times 300 \text{ nm}^2$), in order to obtain elemental maps of several areas of these deposits [185]. Figure 19 shows a typical X-ray fluorescence spectrum in which contributions of different elements appear, namely S, Ca, Ti, Fe, Zn and Br.

As we can see on Figure 19, XRF spectroscopy is able to detect different elements in biopsy [186,187]

and thus can play a major role in metal intoxication [188]. Here we would like to consider three of them namely sulfur, zinc and titanium and thus discuss health problems not connected to pathological calcifications. X-ray Sulfur detection in human hair fibers (Figure 19) is due to the fact that hair is primarily composed of keratin proteins with a very high content of cysteine, a sulfur-containing amino acid, which commonly forms cystine via a disulfide bond [189,190]. The detection of sulfur in hair by XRF and XANES in dementia has been discussed, for example by Siritapetawee *et al.* [191] in the context of possible roles of calcium, chlorine, phosphorus and

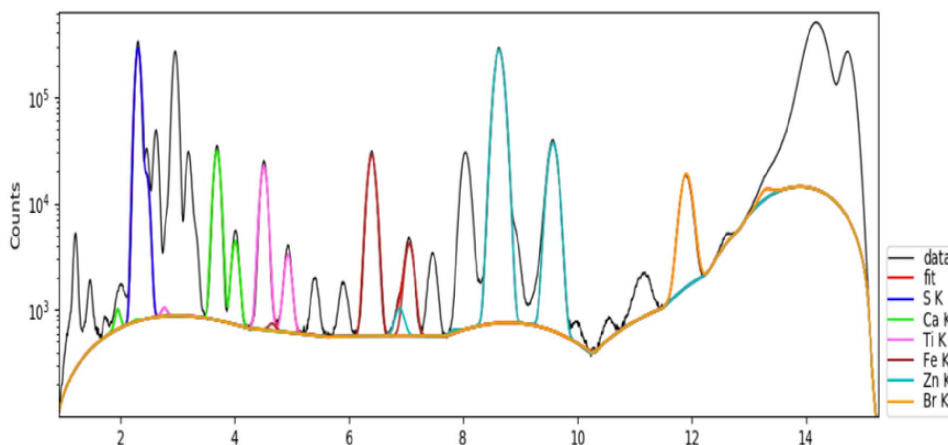


Figure 19. Typical X-ray fluorescence spectrum collected from a hair with the contributions of S (K_{α} at 2.31 keV, K_{β} at 2.46 keV), Ca (K_{α} at 3.69 keV, K_{β} at 4.01 keV) Ti (K_{α} at 4.51 keV, K_{β} at 4.93 keV), Fe (K_{α} at 6.40 keV, K_{β} at 7.06 keV), Zn (K_{α} at 8.638 keV, K_{β} at 9.572 keV) and Br (K_{α} at 11.92 keV, K_{β} at 13.29 keV).

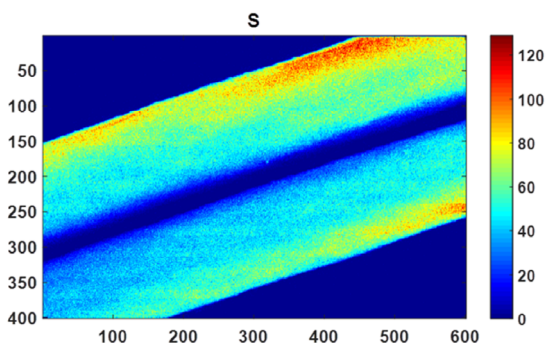


Figure 20. Micro X-ray fluorescence spectroscopy: high 500 nm resolution distribution maps of sulfur (S) within a hair shaft.

sulfur in the etiology of elderly patients' dementia. Also, Inoue *et al.* [189] showed that it is possible to map the oxidation state of cysteine in human hair through Xanes spectroscopy. In our experiment (Figure 20), it is quite clear that the nanometer scale resolution allows us to precisely define the distribution of sulfur in hair.

Numerous publications have discussed the presence of Zn in hairs. A first investigation performed by Bertazzo *et al.* [192] determined the Cu and Zn levels of both 607 men (1–85 y old) and 649 women (1–92 y old) by atomic absorption spectrometry. These authors noticed that sex does not influence Zn content

($200.97 \pm 9.68 \mu\text{g/g}$ for men and $209.81 \pm 9.49 \mu\text{g/g}$ hair for women). Subsequently Dastgheib *et al.* [193] investigated the relationship between alopecia areata (AA) and iron, zinc, and copper levels in serum and hair. According to their data, there was no statistically significant difference between trace elements among AA patients and control patients. Such a conclusion is not in line with Ozaydin-Yavuz *et al.*'s publication [194]. These authors found that low levels of Zn and Mn are associated with AA while other metals were normal: Zn supplementation may therefore have some beneficial effect in AA. In our case, it is quite difficult to extract a conclusion regarding the spatial repartition of Zn in hairs (Figure 21). As underlined by Nicolis *et al.* [195], the usual techniques applied to human hair analysis yield a mean concentration, whilst the analysis of a single hair reveals important fluctuations in three levels: with time (along the hair), between the hairs of the same person, as well as between the hairs of different people.

Finally, it is worth noting that various shampoos contain zinc; clinical studies have established that Zn pyrithione is one of the most effective anti-dandruff ingredients in shampoo formulations [189–191,196].

We paid particular attention to Ti. TiO_2 microparticles (0.5–1 μm) were detected along the surface of follicles thanks to the high sensitivity of the Nanoscopium beamline (Figure 22).

As in tattoo associated KA, we have also used Ra-

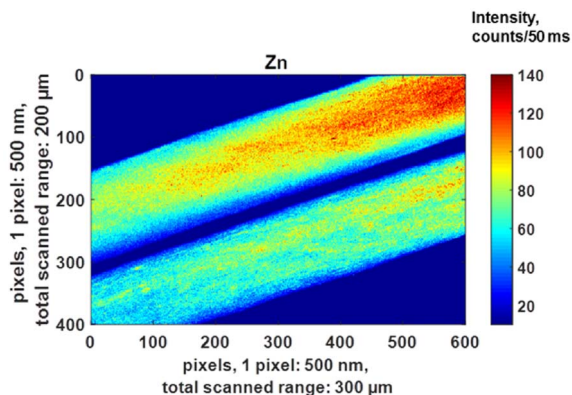


Figure 21. Micro X-ray fluorescence spectroscopy: high 500 nm resolution distribution maps of Zn within a hair shaft.

man spectroscopy in FFA, allowing us to both localize TiO_2 and identify its crystalline form i.e. whether anatase or rutile (Figure 23).

The hypothesis formulated by the researchers to explain FFA is that TiO_2 provokes an inflammatory reaction [192–194,197–199]. Up to now, there is no data available concerning the impact of TiO_2 exposure on hair. However, the detection of TiO_2 along the hair shafts of our patient raises the question of possible implication of TiO_2 in FFA pathogenesis: these inflammatory reactions, when occurring in the bulge of the hair follicle, could lead to the destruction of the stem cells located within the bulge. Dynamic studies on hair follicles extracted after application of cream containing TiO_2 , with measurements of nanoparticles on different parts of the hair follicle, as well as more detailed analyses to characterize the exact location of the nanoparticles, are necessary to confirm the potential link between FFA and TiO_2 nanoparticles.

5. *In vivo* characterization

In vivo characterization is a promising approach for the clinician. Among those physicochemical characterization techniques able to collect data on skin *in vivo* are Raman spectroscopy [195,200–203], FTIR spectroscopy [204,205], X-ray fluorescence [206,207] and Optical Coherence Tomography (OCT). We have used two of these: OCT in sarcoidosis and FTIR spectroscopy on tattoos.

OCT is a technology based on low-coherence optical interferometry to image biological tissues with a micrometer-scale spatial resolution [208,209]. It is commonly used in several medical fields [210], especially in ophthalmology to obtain images of the retina and the anterior segment of the eye [211]. Moreover, OCT has begun to be used in interventional cardiology [212], and in gastro-enterology for the detection and diagnosis of tumors [213,214]. OCT can be a useful tool for non-invasive imaging of brain tissues [215,216], and shows promise in dermatology to improve the diagnosis of skin lesions [217,218].

In this study, we used a commercially available swept-source OCT device (Thorlabs, OCS1300SS) operating in the near-infrared at a center wavelength of 1300 nm, producing images with a spatial resolution of $12\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ (axial $\times$ transverse). Figure 24 shows an example of an OCT image obtained from a biopsy of skin sarcoidosis embedded in paraffin. OCT is effective in identifying granulomas in the dermis, suggesting that this technique could also be used to diagnose cutaneous sarcoidosis *in vivo*, which would prevent the patient from having to undergo a biopsy.

Finally, we have recently tested the acquisition of *in vivo* FTIR spectra using an Agilent 4300 Handheld FTIR spectrometer. The experimental setup, routinely used for archeomaterials [219], allows the acquisition of infrared spectra in the range $5000\text{--}650\ \text{cm}^{-1}$ with a spectral resolution of $4\ \text{cm}^{-1}$. The detector is thermal and the signal is related to a change in temperature caused by the absorption of the infrared radiation. Experiments were performed in attenuated total reflection mode (with a $2\ \mu\text{m}$ typical penetration depth) using a diamond interface window on a patient with a tattoo. A set of infrared spectra were collected (Figure 25): it is clear that the signal to noise is excellent and thus it seems possible to extract spectral information regarding the chemical composition of the tattoos. Following these preliminary experiments, we have started an investigation in order to analyse quantitatively these IR spectra.

6. Conclusion and perspectives

This contribution exemplifies different physicochemical techniques, encompassing imaging at the submicrometer scale by FE-SEM, chemical identification by two vibrational spectroscopies namely

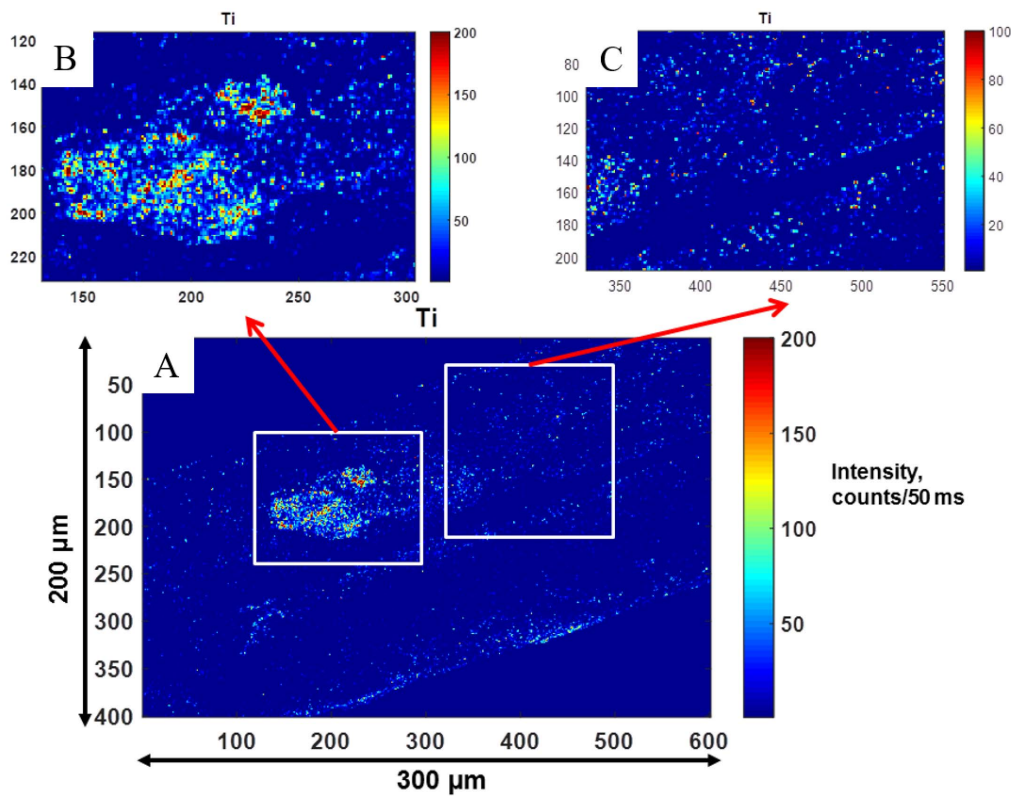


Figure 22. Nano X-ray fluorescence spectroscopy: high 500 nm resolution distribution maps of Ti within a hair sample. Red color areas correspond to a high concentration of Ti.

FTIR and Raman, as well as techniques specific to synchrotron radiation such as XRF and XANES, have been used to describe both endogenous and exogenous skin deposits.

The complete set of results demonstrates clearly that, although carbapatite is usually identified in endogenous deposits, various other chemical compounds can be identified. Such chemical diversity in skin calcifications suggests different biochemical mechanisms. We have also demonstrated the variety of structures and locations adopted by such skin deposits.

Regarding exogenous skin deposits, we identified PAA and metal oxides in KA, which were strongly correlated with the position of the tumour, and identified TiO_2 in FFA, which was closely located next to the area rich in stem cells of the hair follicle. This co-localization suggests a direct involvement of these compounds in these diseases.

In the near future, we would like to apply other

tools in various skin diseases. Nowadays, it is possible to perform a description of the pathological calcifications at the nanometer scale. Transmission electron microscopy (TEM) has already been used and such description has led to different scientific breakthroughs [220–222]. Combining TEM and electron energy loss experiments tells the clinician the morphology and the elemental composition of abnormal tissue deposits at the nanometre scale [223,224]. There is also now the possibility of identifying chemical composition by the acquisition of NanoInfrared spectra [225–228].

Other tools, such as UV spectroscopy [229–231] or Second Harmonic Generation (SHG) [232–234] are also very interesting for the exploration of skin diseases. We have obtained promising preliminary results at the Disco beamline, Synchrotron Soleil, and we will proceed with more analyses in the future. Figure 26 shows as an example of spontaneous fluorescence within sweat glands (red arrow).

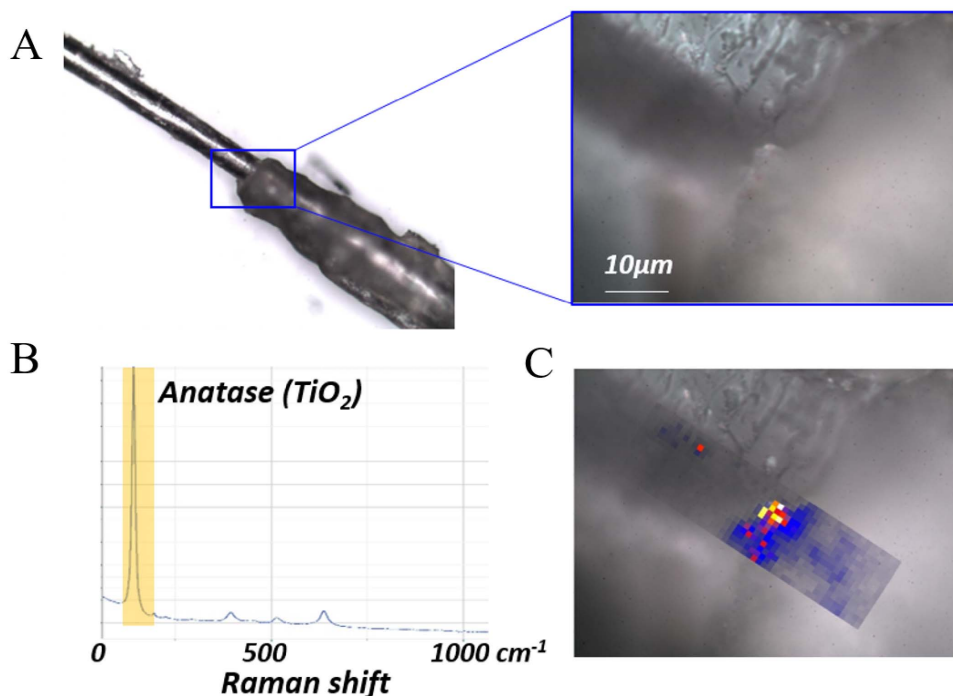


Figure 23. Raman characterization of a hair follicle from a patient with frontal fibrosing alopecia: (a) Optical micrograph at 10× and 100× magnification, (b) Raman spectrum (785 nm, laser power: 22.5 mW Acq. time = 0.5 s) revealing the presence of anatase and (c) Raman mapping by integration of the intensity of the 142 cm⁻¹ band of anatase over the energy range 120–160 cm⁻¹, showing a high concentration of anatase at the hair/follicle junction.

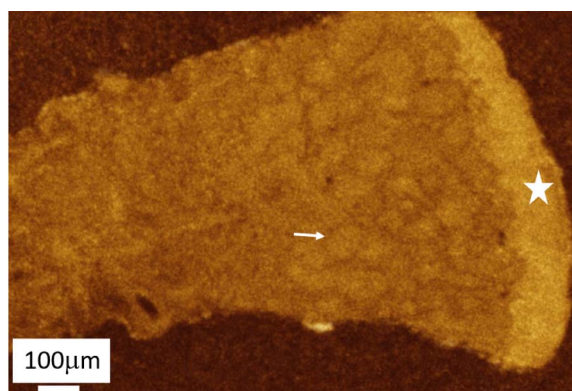


Figure 24. OCT analysis in skin sarcoidosis: epidermis (dot), dermis and clear visualisation of many granulomas (arrow).

Synchrotron radiation provides other opportunities for nanometer scale definition. For example, scanning transmission X-ray microscopy performed

at the carbon K-edge and at the Ca L_{2,3}-edges can accurately assess the pathogenesis of calcifications inside bacteria [235].

Finally, all these nanometer scale experimental data have to be considered via a “bottom-up” approach based on DFT model chemistry [236–238]. Such a theoretical approach can model different kinds of apatite/biomolecule [239–241] and metal or metal oxide/small molecule interactions [242–244] which can have a major influence in the case of tattoos.

Further collaborations and studies are therefore projected, including multiphoton microscopy analyses, in order to provide a better understanding of skin diseases associated with endogenous and exogenous deposits, and hopefully improve their treatment.

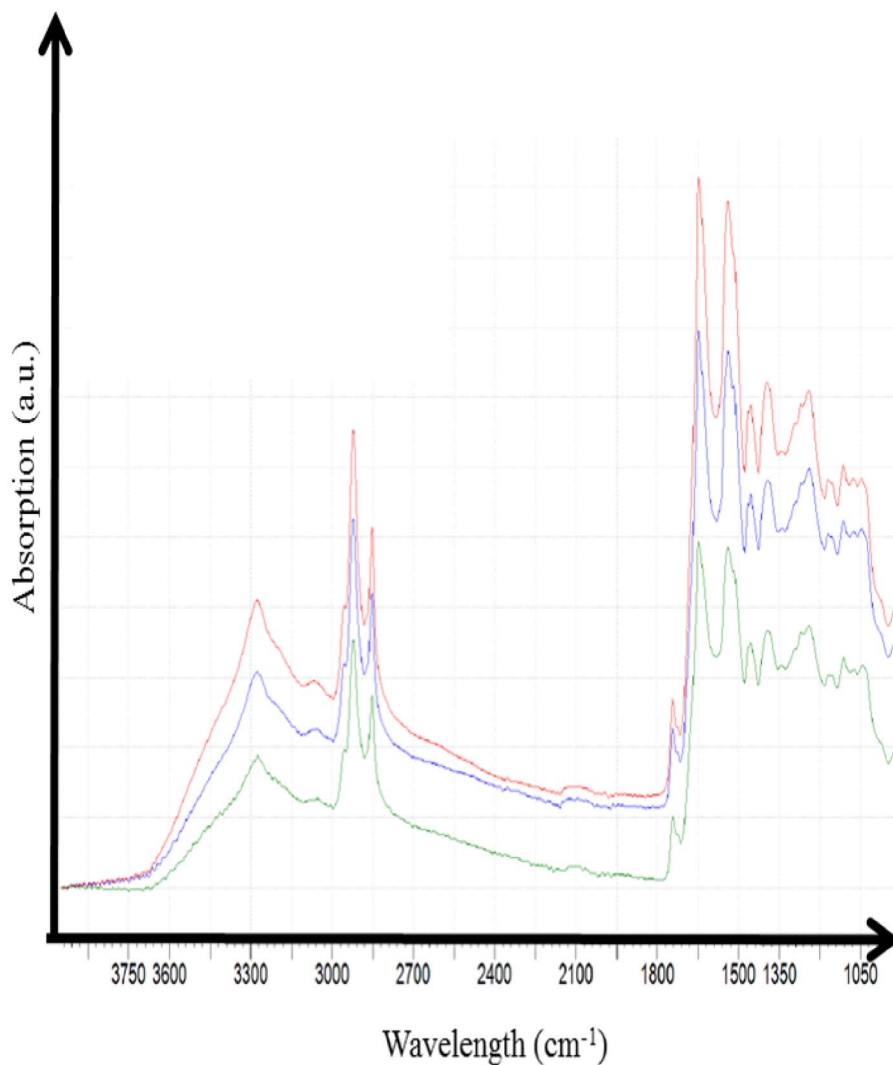


Figure 25. *In vivo* infrared spectra of a skin tattoo acquired with a portable infrared experimental setup.

Conflicts of interest

Authors have no conflict of interest to declare.

to thank the clusters of excellence MiChem and Matisse (ANR-11-IDEX-0004-02) led by Sorbonne Université. We would like to thank the “Fondation pour la Recherche Médicale” for their financial support of these studies.

Acknowledgments

We acknowledge SOLEIL for providing access to their Synchrotron radiation facilities (proposals 20170374 and 2018362) and we would like to thank the Dif-fAbs, Nanoscopium and Disco beamlines teams for their assistance during experiments. We would like

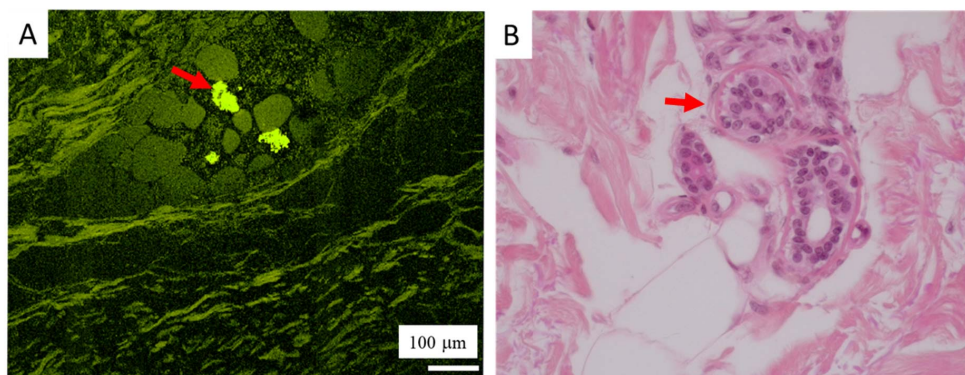


Figure 26. Comparison of SHG and optical microscopy. (A) Spontaneous fluorescence is observed within sweat glands (red arrow), here surrounded by adipocytes. (B) HES $\times 400$, sweat glands (red arrow), also surrounded by adipocytes.

References

- [1] D. Bazin, M. Daudon, C. Combes, C. Rey, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 5092-5120.
- [2] D. Bazin, M. Daudon, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2012, **45**, article no. 383001.
- [3] L. N. Poloni, M. D. Ward, *Chem. Mater.*, 2014, **26**, 477-495.
- [4] E. Tsolaki, S. Bertazzo, *Materials*, 2019, **12**, article no. 3126.
- [5] D. Bazin, M. Daudon, *J. Spectral Imaging*, 2019, **8**, article no. a16.
- [6] N. Vidavsky, J. A. M. R. Kunitake, L. A. Estroff, *Adv. Healthc. Mater.*, 2020, article no. e2001271.
- [7] A. M. Molina-Ruiz, L. Cerroni, H. Kutzner, L. Requena, *Am. J. Dermatopathol.*, 2014, **36**, 1-48.
- [8] F. Rongioletti, "Exogenous cutaneous deposits with special consideration to skin reactions to soft-tissue fillers", in *Clinical and Pathological Aspects of Skin Diseases in Endocrine, Metabolic, Nutritional and Deposition Disease* (B. Smoller, F. Rongioletti, eds.), Springer, New York, NY, 2010.
- [9] M.-T. Liu, W.-T. Cheng, M.-J. Li, H.-N. Liu, D.-M. Yang, S.-Y. Lin, *Arch. Dermatol. Res.*, 2005, **297**, 231-234.
- [10] V. Rafnsson, O. Ingimarsson, I. Hjalmarsson, H. Gunnarsdottir, *Occup. Environ. Med.*, 1998, **55**, 657-660.
- [11] L. E. Bonewald, S. E. Harris, J. Rosser, M. R. Dallas, S. Dallas, N. P. Camacho, B. Boyan, A. Boskey, *Calcif. Tissue Int.*, 2003, **72**, 537-547.
- [12] M. Daudon, D. Bazin, "New techniques to characterize kidney stones and Randall's plaque", in *Urolithiasis: Basic Science and Clinical Practice* (J. J. Talati, H. G. Tiselius, D. M. Albala, Z. Ye, eds.), Springer, London, 2012, 683-707.
- [13] D. Bazin, Ch. Jouanneau, S. Bertazzo, Ch. Sandt, A. Dessombz, M. Réfrégiers, P. Dumas, J. Frederick, J.-Ph. Haymann, E. Letavernier, P. Ronco, M. Daudon, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1439-1454.
- [14] V. Frochot, D. Bazin, E. Letavernier, Ch. Jouanneau, J.-Ph. Haymann, M. Daudon, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1565-1572.
- [15] H. Bilbault, J. Perez, L. Huguet, S. Vandermeersch, S. Placier, N. Tabibzadeh, V. Frochot, E. Letavernier, D. Bazin, M. Daudon, J.-P. Haymann, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, article no. 16319.
- [16] A. Dessombz, P. Méria, D. Bazin, M. Daudon, *PLoS One*, 2012, **7**, article no. e51691.
- [17] A. Dessombz, P. Méria, D. Bazin, E. Foy, S. Rouzière, R. Weil, M. Daudon, *Prog. Urol.*, 2011, **21**, 940-945.
- [18] M. Mathonnet, A. Dessombz, D. Bazin, R. Weil, F. Triponez, M. Pusztaszeri, M. Daudon, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1672-1678.
- [19] J. Guerlain, S. Perie, M. Lefevre, J. Perez, S. Vandermeersch, Ch. Jouanneau, L. Huguet, V. Frochot, E. Letavernier, R. Weil, S. Rouzière, D. Bazin, M. Daudon, J. P. Haymann, *PLoS One*, 2019, **14**, article no. e0224138.
- [20] F. Brisset, M. Repoux, J. Ruste, F. Grillon, F. Robaut, *Microscopie Electronique à Balayage et Microanalyses*, EDP Sciences, Les Ulis, 2009.
- [21] D. Bazin, M. Daudon, *Ann. Biol. Clin.*, 2015, **73**, 517-534.
- [22] D. Bazin, E. Boudierlique, M. Daudon, V. Frochot, J.-Ph. Haymann, E. Letavernier, F. Tielens, R. Weil, *C. R. Chim.*, 2022, **25**, 1-24.
- [23] A. Dessombz, C. Nguyen, H.-K. Ea, S. Rouzière, E. Foy, D. Hannouche, S. Réguer, F.-E. Picca, D. Thiaudière, F. Lioté, M. Daudon, D. Bazin, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2013, **27**, 326-333.
- [24] S. Rouzière, D. Bazin, M. Daudon, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1404-1415.
- [25] D. Bazin, E. Foy, S. Reguer, S. Rouzière, B. Fayard, H. Colboc, J.-Ph. Haymann, M. Daudon, C. Mocuta, *C. R. Chim.*, 2022, **25**, 1-24.
- [26] A. Guinier, *Théorie et technique de la radiocristallographie*, Dunod, Paris, 1964.
- [27] D. Bazin, C. Chappard, C. Combes, X. Carpentier, S. Rouzière, G. André, G. Matzen, M. Allix, D. Thiaudière, S. Reguer, P. Jungers, M. Daudon, *Osteoporos. Int.*, 2009, **20**, 1065-1075.
- [28] S. Reguer, C. Mocuta, D. Thiaudière, M. Daudon, D. Bazin, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1424-1431.
- [29] D. Bazin, V. Frochot, J.-Ph. Haymann, E. Letavernier, M. Daudon, *C. R. Chim.*, 2022, **25**, 1-15.

- [30] N. Quy Dao, M. Daudon, *Infrared and Raman Spectra of Calculi*, Elsevier, Paris, 1997.
- [31] L. Estepa, M. Daudon, *Biospectroscopy*, 1997, **3**, 347-369.
- [32] S. Y. Lin, *Expert Rev. Mol. Med.*, 2014, **16**, article no. e6.
- [33] M. Daudon, D. Bazin, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1416-1423.
- [34] I. T. Lucas, D. Bazin, M. Daudon, *C. R. Chim.*, 2022, **25**, 1-21.
- [35] S. Tamosaityte, M. Pucetaite, A. Zelvy, S. Varvuolyte, V. Hendrixson, V. Sablinskas, *C. R. Chim.*, 2022, **25**, 1-10.
- [36] D. Bazin, M. Daudon, P. Chevallier, S. Rouzière, E. Elkaim, D. Thiaudière, B. Fayard, E. Foy, P. A. Albouy, G. André, G. Matzen, E. Véron, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 2006, **64**, 125-139.
- [37] D. Bazin, J.-Ph. Haymann, E. Letavernier, J. Rode, M. Daudon, *Presse Med.*, 2014, **43**, 135-148.
- [38] M. Daudon, D. Bazin, *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2013, **425**, article no. 022006.
- [39] D. Bazin, E. Letavernier, J.-P. Haymann, P. Méria, M. Daudon, *Prog. Urol.*, 2016, **26**, 608-618.
- [40] D. E. Sayers, F. W. Lytle, E. A. Stern, *Adv. X-ray Anal.*, 1970, **13**, 248-271.
- [41] J. J. Rehr, A. L. Ankudinov, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **249**, 131-140.
- [42] D. Bazin, D. Sayers, J. Rehr, *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 11040-11050.
- [43] D. Bazin, D. Sayers, J. J. Rehr, C. Mottet, *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 5332-5336.
- [44] D. Bazin, J. J. Rehr, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 12398-12402.
- [45] D. Bazin, S. Reguer, D. Vantelon, J.-Ph. Haymann, E. Letavernier, V. Frochot, M. Daudon, E. Esteve, H. Colboc, *C. R. Chim.*, 2022, **25**, 1-20.
- [46] D. Bazin, E. Letavernier, J. P. Haymann, V. Frochot, M. Daudon, *Ann. Biol. Clin.*, 2020, **78**, 349-362.
- [47] M. Daudon, P. Jungers, D. Bazin, *New England J. Med.*, 2008, **359**, 100-102.
- [48] D. Bazin, G. André, R. Weil, G. Matzen, E. Véron, X. Carpentier, M. Daudon, *Urology*, 2012, **79**, 786-790.
- [49] A. Dessombz, E. Letavernier, J.-Ph. Haymann, D. Bazin, M. Daudon, *J. Urol.*, 2015, **193**, 1564-1569.
- [50] S. Kaščáková, C. M. Kewish, S. Rouzière, F. Schmitt, R. Sobesky, J. Poupon, C. Sandt, B. Francou, A. Somogyi, D. Samuel, E. Jacquemin, A. Dubart-Kupperschmitt, T. H. Nguyen, D. Bazin, J.-C. DuclosVallée, C. Guettier, F. Le Naour, *J. Pathol. Clin. Res.*, 2016, **2**, 175-186.
- [51] D. Bazin, M. Daudon, G. André, R. Weil, E. Véron, G. Matzen, *J. Appl. Crystallogr.*, 2014, **47**, 719-725.
- [52] N. Reiter, L. El-Shabrawi, B. Leinweber, A. Berghold, E. Aberer, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2011, **65**, 14-15.
- [53] J. S. Walsh, J. A. Fairley, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1995, **33**, 693-706.
- [54] A. Valenzuela, L. Chung, *Curr. Treat Options Rheumatol.*, 2016, **2**, 85-96.
- [55] A. G. Tristano, J. L. Villarreal, M. A. Rodríguez, A. Millan, *Clin. Rheumatol.*, 2006, **25**, 70-74.
- [56] B. C. Presley, J. S. Bush, S. C. Watson, *West J. Emerg. Med.*, 2012, **13**, 136-138.
- [57] O. Le Saux, Z. Urban, C. Tschuch, K. Csiszar, B. Bacchelli, D. Quaglino, I. Pasquali-Ronchetti, F. Michael Pope, A. Richards, S. Terry, L. Bercovitch, A. de Paepe, C. D. Boyd, *Nat. Genet.*, 2000, **25**, article no. 223.
- [58] S. E. Lee, S. Hun, *Ann. Dermatol.*, 2018, **30**, 265-275.
- [59] A. B. G. Lansdown, *Wound Rep. Reg.*, 2002, **10**, 271-285.
- [60] M. P. Adams, D. G. Mallet, G. J. Pettet, *PLoS One*, 2015, **10**, article no. e0116751.
- [61] P. Henrot, A. Leroux, C. Barlier, P. Génin, *Diagn. Interv. Imaging*, 2014, **95**, 141-152.
- [62] A. B. Lakhdar, M. Daudon, M. C. Mathieu, A. Kellum, C. Balleyguier, D. Bazin, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1610-1624.
- [63] H. Colboc, Ph. Moguelet, D. Bazin, P. Carvalho, A.-S. Dillies, G. Chaby, H. Maillard, D. Kottler, E. Goujon, Ch. Juras, M. Panaye, V. Frochot, E. Letavernier, M. Daudon, I. Lucas, R. Weil, Ph. Courville, J.-B. Monfort, F. Chasset, P. Senet, *JAMA Dermatol.*, 2019, **155**, 789-796.
- [64] L. M. Pachman, A. Veis, S. Stock, K. Abbott, F. Vicari, P. Patel, D. Giczewski, C. Webb, L. Spevak, A. L. Boskey, *Arthritis Rheumatol.*, 2006, **54**, 3345-3350.
- [65] R. Kramann, V. M. Brandenburg, L. J. Schurgers, M. Keteler, S. Westphal, I. Leisten, M. Bovi, W. Jahnen-Dechent, R. Knüchel, J. Floege, R. K. Schneider, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2013, **28**, 856-868.
- [66] T. Oginio, T. Suzuki, K. Sawada, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1987, **51**, 2757-2767.
- [67] J. D. Reid, M. E. Andersen, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1988, **90**, 545-585.
- [68] C. J. Cros, D. Bazin, A. Kellum, V. Rebours, M. Daudon, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1642-1664.
- [69] J.-K. Yua, H. Pan, Sh.-M. Huang, N.-L. Huang, Ch.-Ch. Yao, K.-M. Hsiao, Ch.-W. Wu, *Asian J. Surg.*, 2013, **36**, 26-35.
- [70] S. Kraaij, H. S. Brand, E. H. van der Meij, J.-G. de Visscher, *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal*, 2018, **23**, article no. e540.
- [71] J. A. Terzakis, W. J. Eisenmenger, J. J. Reidy, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1984, **82**, 236-239.
- [72] M. Daudon, H. Bouzidi, D. Bazin, *Urol. Res.*, 2010, **38**, 459-467.
- [73] H.-K. Ea, Ch. Nguyen, D. Bazin, A. Bianchi, J. Guicheux, P. Reboul, M. Daudon, F. Lioté, *Arthritis Rheum.*, 2010, **63**, 10-18.
- [74] S. De Santis, G. Sotgiu, A. Crescenzi, C. Taffon, A. C. Felici, M. Orsini, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2020, **190**, article no. 113534.
- [75] J. M. Richards, J. A. M. R. Kunitake, H. B. Hunt, A. N. Wnorowski, D. W. Lin, A. L. Boskey, E. Donnelly, L. A. Estroff, J. T. Butcher, *Acta Biomater.*, 2018, **71**, 24-36.
- [76] J. A. M. R. Kunitake, S. Choi, K. X. Nguyen, M. M. Lee, F. He, D. Sudilovsky, P. G. Morris, M. S. Jochelson, C. A. Hudis, D. A. Muller, P. Fratzl, C. Fischbach, A. Masic, L. A. Estroff, *J. Struct. Biol.*, 202, **2018**, 25-34.
- [77] Ch. Rey, Ch. Combes, Ch. Drouet, H. Sfihi, A. Barroug, *Mater. Sci. Eng.*, 2007, **C27**, 198-205.
- [78] S. Cazalbou, D. Eichert, Ch. Drouet, Ch. Combes, Ch. Rey, *C. R. Paleontol.*, 2004, **3**, 563-572.
- [79] M. Iafisco, J. M. Delgado-Lopez, C. Drouet, in *Apatites: Synthesis, Structural Characterization and Biomedical Applications* (M. Iafisco, J. M. Delgado-Lopez, eds.), Nova Science Publishers, New York, 2014, Chapter 2, eBook.
- [80] Ch. Combes, S. Cazalbou, Ch. Rey, *Minerals*, 2016, **6**, article no. 34.
- [81] I. Russoni de Lima, G. Gomes Alves, C. A. Soriano, A. P. Campanelli, Th. H. Gasparoto, E. S. Ramos Jr., L. Á. de Sena,

- A. M. Rossi, J. M. Granjeiro, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2011, **98**, 351-358.
- [82] D. Bazin, M. Daudon, Ch. Chappard, J. J. Rehr, D. Thiaudière, S. Reguer, *J. Synchrotron Radiat.*, 2011, **18**, 912-918.
- [83] D. Bazin, A. Dessombz, Ch. Nguyen, H. K. Ea, F. Lioté, J. Rehr, Ch. Chappard, S. Rouzière, D. Thiaudière, S. Reguer, M. Daudon, *J. Synchrotron Radiat.*, 2014, **21**, 136-142.
- [84] X. Carpentier, D. Bazin, Ch. Combes, A. Mazouyes, S. Rouzière, P. A. Albouy, E. Foy, M. Daudon, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2011, **25**, 160-165.
- [85] S. Naray-Szabo, *Z. Kristallogr Kristallgeom Kristallphys Kristallchem*, 1930, **75**, 387-398.
- [86] T. J. White, D. Zhi Li, *Acta Crystallogr.*, 2003, **B 59**, 1-16.
- [87] J. C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- [88] M. Vallet-Regi, M. J. Gonzalez-Calbet, *Prog. Solid State Chem.*, 2004, **32**, 1-31.
- [89] S. Ouizat, A. Barroug, A. Legrouri, C. Rey, *Mater. Res. Bull.*, 2000, **34**, 2279-2289.
- [90] Ch. Drouet, Ch. Rey, *Nanostructured Biomaterials for Regenerative Medicine*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Woodhead Publishing, Cambridge, 2020, 223-254 pages.
- [91] C. Rey, J. L. Miquel, L. Facchini, A. P. Legrand, M. J. Glimcher, *Bone*, 1995, **16**, 583-586.
- [92] C. K. Loong, Ch. Rey, L. T. Kuhn, Ch. Combes, Y. Wu, S. H. Chen, M. J. Glimcher, *Bone*, 2000, **26**, 599-602.
- [93] G. Cho, Y. Wu, J. L. Ackerman, *Science*, 2003, **300**, 1123-1127.
- [94] R. Legros, N. Balmain, G. Bonel, *Calcif. Tissue Int.*, 1987, **41**, 137-144.
- [95] X. Carpentier, M. Daudon, O. Traxer, P. Jungers, A. Mazouyes, G. Matzen, E. Véron, D. Bazin, *Urology*, 2009, **73**, 968-975.
- [96] M. Daudon, D. Bazin, G. André, P. Jungers, A. Cousson, P. Chevallier, E. Véron, G. Matzen, *J. Appl. Crystallogr.*, 2009, **42**, 109-115.
- [97] A. S. Prasad, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2014, **28**, 364-371.
- [98] N. Z. Gammoh, L. Rink, *Nutrients*, 2017, **9**, article no. 624.
- [99] C. P. Wild, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2005, **14**, 1847-1850.
- [100] J. Lademann, H. Weigmann, C. Rickmeyer, H. Barthelmes, H. Schaefer, G. Mueller, W. Sterry, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 1999, **12**, 247-256.
- [101] R. G. M. Keijsers, D. A. F. van den Heuvel, J. C. Grutters, *Eur. Respir. J.*, 2013, **41**, 743-751.
- [102] B. P. Barna, M. A. Judson, M. J. Thomassen, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2021, **1304**, 39-52.
- [103] S. A. Ma, S. Imadojemu, K. Beer, J. T. Seykora, *J. Cutan. Pathol.*, 2017, **44**, 672-676.
- [104] F. Brunet-Possenti, L. Deschamps, H. Colboc, A. Somogyi, K. Medjoubi, D. Bazin, V. Descamps, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2018, **32**, e442-e443.
- [105] R. Ruiz-Villaverde, P. Fernandez-Crehuet, P. Aguayo-Carreras, J. L. Hernandez-Centeno, C. Cuenca-Barrales, *Sultan Qaboos Univ. Med. J.*, 2018, **18**, e215-e218.
- [106] R. Bose, Ch. Sibley, S. Fahim, *SAGE Open Med. Case Rep.*, 2020, **8**, article no. 2050313X20936036.
- [107] R. H. Weenig, L. D. Sewell, M. D. Davis, J. T. McCarthy, M. R. Pittelkow, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2007, **56**, 569-579.
- [108] S. U. Nigwekar, S. Zhao, J. Wenger, J. L. Hymes, F. Maddux, R. I. Thadhani, K. E. Chan, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2016, **27**, 3421-3429.
- [109] S. U. Nigwekar, R. Thadhani, V. M. Brandenburg, *N. Engl. J. Med.*, 2018, **378**, 1704-1714.
- [110] Z. Yu, L. Gu, H. Pang, Y. Fang, H. Yan, W. Fang, *Case Rep. Nephrol. Dial.*, 2015, **5**, 77-82.
- [111] H.-K. Sin, P.-N. Wong, K.-Y. Lo, M.-W. Lo, S.-F. Chan, K.-C. Lo, Y.-Y. Wong, L.-Y. Ho, W.-T. Kwok, K.-C. Chan, A. K.-M. Wong, S.-K. Mak, *Transplant. Rep.*, 2020, **5**, article no. 100068.
- [112] E. A. Ross, *Am. J. Nephrol.*, 2011, **34**, 460-467.
- [113] G. Munavalli, A. Reisenauer, M. Moses, S. Kilroy, J. L. Arbiser, *J. Dermatol.*, 2003, **30**, 915-919.
- [114] L. Amuluru, W. High, K. M. Hiatt, J. Ranvill, S. V. Shah, B. Malik, S. Swaminathan, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2009, **61**, 73-79.
- [115] W. T. Longcope, *J. Am. Med. Assoc.*, 1941, **117**, 1321-1327.
- [116] N. Danbolt, *Postgrad. Med. J.*, 1958, **34**, 245-247.
- [117] ATS Board of Directors and ERS Executive Committee, "Statement on Sarcoidosis. Joint statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG)", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, **160**, no. 2, 736-755.
- [118] E. A. Bresnitz, B. L. Strom, *Epidemiol. Rev.*, 1983, **5**, 124-156.
- [119] L. S. Newman, C. S. Rose, L. A. Maier, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **336**, 1224-1234.
- [120] M. A. Hilal, J. Krotva, L. Chichierchio, N. Obeidat, M. Madanat, *G. Ital. Dermatol. Venereol.*, 2010, **145**, 733-745.
- [121] A. Lyons, G. Brayman, S. Tahhan, *J. Gen. Intern. Med.*, 2018, **33**, 128-129.
- [122] S. M. Ali, A. C. Gilliam, R. T. Brodell, *J. Cutan. Med. Surg.*, 2008, **12**, 43-48.
- [123] S. Zhao, Q. Wang, B. Cheng, X.-F. Zhu, *Exp. Ther. Med.*, 2017, **13**, 1535-1537.
- [124] J. Müller-Quernheim, M. Schürmann, S. Hofmann, K. I. Gaede, A. Fischer, A. Prasse, G. Zissel, S. Schreiber, *Clin. Chest Med.*, 2008, **29**, 391-414.
- [125] J. L. Berlin, G. P. Shantha, H. Yeager, L. Thomas-Hemak, *BMJ Case Rep.*, 2014, **2014**, 1-4.
- [126] R. P. Baughman, A. S. Teirstein, M. A. Judson, M. D. Rossman, H. Yeager Jr., E. A. Bresnitz, L. DePalo, G. Hunninghake, M. C. Iannuzzi, C. J. Johns, G. McLennan, D. R. Moller, L. S. Newman, D. L. Rabin, C. Rose, B. Rybicki, S. E. Weinberger, M. L. Terrin, G. L. Knatterud, R. Cherniak, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, **164**, 1885-1889.
- [127] K. A. Wanat, M. Rosenbach, *Clin. Chest Med.*, 2015, **36**, 685-702.
- [128] J. P. Callen, *Arch. Dermatol.*, 2001, **137**, 485-486.
- [129] J. Marcoval, A. Moreno, J. Mana, *J. Cutan. Pathol.*, 2004, **31**, 516-517.
- [130] N. M. Walsh, J. G. Hanly, R. Tremaine, S. Murray, *Am. J. Dermatopathol.*, 1993, **15**, 203-207.
- [131] Y. C. Kim, M. K. Triffet, L. E. Gibson, *Am. J. Dermatopathol.*, 2000, **22**, 408-412.
- [132] G. Takemura, Y. Takatsu, K. Ono, T. Miyatake, M. Ono, T. Izumi, H. Fujiwara, *Heart Vessels*, 1995, **10**, 275-278.
- [133] Y. Kuribayashi, K. Ohtani, T. Saito, T. Ide, *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging*, 2017, **18**, 944-945.
- [134] M. Catinon, C. Chemarin, F. Thiviolet, M. Kambouchner, J.-F. Bernaudin, C. Cavalin, A.-M. Sfarghiu, F. Arbib, O. Freynet,

- N. Freymond, J.-F. Mornex, P.-A. Rosental, M. Vincent, D. Valéry, Ch. Pison, *Eur. Respir. J.*, 2017, **50**, article no. PA3263.
- [135] H. Colboc, D. Bazin, Ph. Moguelet, V. Frochot, R. Weil, E. Letavernier, Ch. Jouanneau, C. Frances, C. Bachmeyer, J.-F. Bernaudin, M. Daudon, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1631-1641.
- [136] H. Colboc, P. Moguelet, D. Bazin, C. Bachmeyer, V. Frochot, R. Weil, E. Letavernier, C. Jouanneau, M. Daudon, J. F. Bernaudin, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2019, **33**, 198-203.
- [137] L. M. Miller, P. Dumas, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 846-857.
- [138] A. Dessombz, D. Bazin, P. Dumas, C. Sandt, J. Sule-Suso, M. Daudon, *PLoS One*, 2011, **6**, article no. e28007.
- [139] D. Bazin, E. Letavernier, J.-Ph. Haymann, F. Tielens, A. Kelum, M. Daudon, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1548-1557.
- [140] W. Herschel, J. L. E. Dreyer, *The Scientific Papers of Sir William Herschel*, Royal Society and Royal Astronomical Society, London, 1912.
- [141] J. Chamberlain, *The Principles of Interferometric Spectroscopy*, Wiley, Chichester, UK, 1979.
- [142] P. R. Griffiths, J. A. Haseeth, *FT-IR Spectroscopy in Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications*, Wiley, New York, 1986, 38 pages.
- [143] D. C. Fernandez, R. Bhargava, S. M. Hewitt, I. W. Levin, *Nat. Biotechnol.*, 2005, **23**, 469-474.
- [144] K. C. Khulbe, T. Matsuura, *Polymer*, 2000, **41**, 1917-1935.
- [145] C. Krafft, D. Codrich, G. Pelizzo, V. Sergio, *J. Biophoton.*, 2008, **1**, 154-169.
- [146] O. P. Sharma, *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2000, **6**, 442-447.
- [147] M. Conron, C. Young, H. L. C. Beynon, *Rheumatology*, 2000, **39**, 707-713.
- [148] G. W. Hunninghake, U. Costabel, M. Ando, R. Baughman, J. F. Cordier, R. du Bois, A. Eklund, M. Kitaichi, J. Lynch, G. Rizzato, C. Rose, O. Selroos, G. Semenzato, O. P. Sharma, *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.*, 1999, **16**, 149-173.
- [149] C. E. Broos, M. Van Nimwegen, H. C. Hoogsteden, R. W. Hendriks, M. Kool, B. van den Blink, *Front Immunol.*, 2013, **4**, article no. 437.
- [150] A. Deter-Wolf, B. Robitaille, L. Krutak, S. Galliot, *J. Archaeol. Sci. Rep.*, 2016, **5**, 19-24.
- [151] N. Kluger, S. Seité, C. Taieb, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2019, **33**, e484-e486.
- [152] N. Kluger, L. Misery, S. Seité, C. Taieb, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2019, **81**, 607-610.
- [153] G. Prior, *Curr. Probl. Dermatol. Basel, Karger*, 2015, **48**, 152-157.
- [154] G. Prior, *Tattoo Inks: Analysis, Pigments, Legislation*, epubli, Berlin, 2014.
- [155] M. Manso, S. Pessanha, M. Guerra, U. Reinholz, C. Afonso, M. Radtke, H. Lourenço, M. L. Carvalho, A. G. Buzanich, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2019, **187**, 596-601.
- [156] H. Petersen, D. Lewé, *Curr. Probl. Dermatol.*, 2015, **48**, 136-141.
- [157] A. L. Timko, C. H. Miller, F. B. Johnson, E. Ross, *Arch Dermatol.*, 2001, **137**, 143-147.
- [158] S. Gaudron, M.-C. Ferrier-Le Bouëdec, F. Franck, M. D'Incan, *Contact Derm.*, 2014, **72**, 97-105.
- [159] J. Serup, K. Hutton Carlsen, N. Dommershausen, M. Sepehri, B. Hesse, C. Seim, A. Luch, I. Schreiber, *Contact Dermatitis*, 2020, **82**, 73-82.
- [160] I. Schreiber, C. Hutzler, S. Andree, P. Laux, A. Luch, *Arch. Toxicol.*, 2016, **90**, 1639-1650.
- [161] P. Piccinini, S. Pakalin, L. Contor, I. Bianchi, C. Senaldi, 2016, Final Report, EUR27947.
- [162] C. of Europe Strasbourg, "Europe C of. Resolution ResAP (2008) 1 on requirements and criteria for the safety of tattoos and permanent make-up (superseding Resolution ResAP (2003) 2 on tattoos and permanent make-up): adopted by the Committee of Ministers on 20 February 2008 at the 1018th meeting of The Ministers' Deputies", 2008.
- [163] P. Laux, T. Tralau, J. Tentschert, A. Blume, S. Al Dahouk, W. Bäuml, E. Bernstein, B. Bocca, A. Alimonti, H. Colebrook, Ch. de Cuyper, L. Dähne, U. Hauri, P. C. Howard, P. Janssen, L. Katz, B. Klitzman, N. Kluger, L. Krutak, Th. Platzek, V. Scott-Lang, J. Serup, W. Teubner, I. Schreiber, E. Wilkniß, A. Luch, *Lancet*, 2016, **387**, 395-402.
- [164] M. Arl, D. J. Nogueira, J. Schweitzer Köerich, N. Motim Justino, D. Schulz Vicentini, W. Gerson Matias, *J. Hazard Mater.*, 2019, **364**, 548-561.
- [165] E. Maxim, H. Higgins, L. D'Souza, *Int. J. Womens Dermatol.*, 2017, **3**, 228-230.
- [166] N. Kluger, D. Douvin, F. Dupuis-Fourdan, J. M. Doumecq-Lacoste, V. Descamps, *Ann. Dermatol. Venereol.*, 2017, **144**, 776-783.
- [167] N. Kluger, V. Koljonen, *Lancet Oncol.*, 2012, **13**, e161-e168.
- [168] N. Kluger, D. Douvin, F. Dupuis-Fourdan, J.-M. Doumecq-Lacoste, V. Descamps, *Ann. Dermatol. Vénéréol.*, 2017, **144**, 776-783.
- [169] H. Colboc, D. Bazin, P. Moguelet, S. Reguer, R. Amode, C. Jouanneau, I. Lucas, L. Deschamps, V. Descamps, N. Kluger, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2020, **34**, e313-e315.
- [170] N. C. Scherrer, Z. Stefan, D. Francoise, F. Annette, K. Renate, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2009, **73**, 505-524.
- [171] K. H. Carlsen, M. Køcks, M. Sepehri, J. Serup, *Skin Res. Technol.*, 2016, **22**, 460-469.
- [172] M. E. Darvin, J. Schleusener, F. Parenz, O. Seidel, C. Krafft, J. Popp, J. Lademann, *Analyst*, 2018, **143**, 4990-4999.
- [173] S. L. Schneider, I. Kohli, I. H. Hamzavi, M. L. Council, A. M. Rossi, D. M. Ozog, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2019, **80**, 1121-1131.
- [174] D. Bersani, P. P. Lottici, A. Montenero, *J. Raman Spectrosc.*, 1999, **30**, 355-360.
- [175] I. Chourpa, L. Douziech-Eyrolles, L. Ngaboni-Okassa, J.-F. Fouquenot, S. Cohen-Jonathan, M. Soucé, H. Marchais, P. Dubois, *Analyst*, 2005, **130**, 1395-1403.
- [176] I. Schreiber, B. Hesse, Ch. Seim, H. Castillo-Michel, J. Villanova, P. Laux, N. Drejack, R. Penning, R. Tucoulou, M. Cotte, A. Luch, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, article no. 11395.
- [177] I. Schreiber, B. Hesse, Ch. Seim, H. Castillo-Michel, L. Anklamm, J. Villanova, N. Drejack, A. Lagrange, R. Penning, Ch. De Cuyper, R. Tucoulou, W. Bäuml, M. Cotte, A. Luch, *Part. Fibre Toxicol.*, 2019, **16**, article no. 33.
- [178] A. Bianconi, A. Congiu-Castellano, M. Dell'Ariccia, A. Giovannelli, P. J. Durham, E. Burattini, M. Barteri, *FEBS Lett.*, 1984, **178**, 165-170.

- [179] *The MAK Collection for Occupational Health and Safety*, vol. 1, Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016.
- [180] P. S. Islam, Ch. Chang, C. Selmi, E. Generali, A. Huntley, S. S. Teuber, M. E. Gershwin, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2016, **50**, 273-286.
- [181] T. Høgsberg, K. Loeschner, D. Löf, J. Serup, *Br. J. Dermatol.*, 2011, **165**, 1210-1218.
- [182] K. T. Tan, A. G. Messenger, *Br. J. Dermatol.*, 2009, **160**, 75-79.
- [183] A. Debroy Kidambi, K. Dobson, S. Holmes, D. Carauna, V. Del Marmol, A. Vujovic, M. R. Kaur, A. Takwale, P. Farrant, C. Champagne, M. Harries, A. G. Messenger, *Br. J. Dermatol.*, 2017, **177**, 260-261.
- [184] J. Lademann, H. Weigmann, C. Rickmeyer, H. Barthelmes, H. Schaefer, G. Mueller, W. Sterry, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 1999, **12**, 247-256.
- [185] A. Somogyi, K. Medjoubi, G. Baranton, V. Le Roux, M. Ribbens, F. Polack, P. Philippot, J. P. Samama, *J. Synchrotron Radiat.*, 2015, **22**, 1118-1129.
- [186] E. Esteve, D. Bazin, Ch. Jouanneau, S. Rouzière, A. Bataille, A. Kellum, K. Provost, Ch. Mocuta, S. Reguer, D. Thiaudiere, K. Jorissen, J. J. Rehr, A. Hertig, E. Rondeau, E. Letavernier, M. Daudon, P. Ronco, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1580-1585.
- [187] E. Esteve, D. Bazin, Ch. Jouanneau, S. Rouzière, A. Bataille, A. Kellum, K. Provost, Ch. Mocuta, S. Reguer, D. Thiaudiere, K. Jorissen, J. J. Rehr, A. Hertig, E. Rondeau, E. Letavernier, M. Daudon, P. Ronco, *C. R. Chim.*, 2016, **19**, 1586-1589.
- [188] E. Esteve, S. Reguer, C. Boissiere, C. Chanéac, G. Lugo, Ch. Jouanneau, C. Mocuta, D. Thiaudière, N. Leclercq, B. Leyh, J.-F. Greisch, J. Berthault, M. Daudon, P. Ronco, D. Bazin, *J. Synchrotron Radiat.*, 2017, **24**, 991-999.
- [189] T. Inoue, K. Takehara, N. Shimizu, Y. Kitajima, K. Shinohara, A. Ito, *J. X-ray Sci. Technol.*, 2011, **19**, 313-320.
- [190] C. Couteau, H. Diarra, Z. Schmitt, L. Coiffard, *Eur. J. Dermatol.*, 2019, **29**, 141-159.
- [191] J. Siritapetawee, W. Pattanasiriwisawa, U. Sirithephawee, *J. Synchrotron Radiat.*, 2010, **17**, 268-272.
- [192] A. Bertazzo, C. Costa, M. Biasiolo, G. Allegri, G. Cirrincione, G. Presti, *Biol. Trace Element Res.*, 1996, **52**, 37-53.
- [193] L. Dastgheib, Z. Mostafavi-pour, A. A. Abdorazagh, Z. Khoshdel, M. S. Sadati, I. Ahrari, S. Ahrari, M. Ghavipisheh, *Dermatol. Res. Pract.*, 2014, **2014**, article no. 784863.
- [194] G. Ozaydin-Yavuz, I. Halil Yavuz, H. Demir, C. Demir, S. G. Bilgili, *Indian J. Dermatol.*, 2019, **64**, 7-11.
- [195] I. Nicolis, P. Deschamps, E. Curis, P. Chevallier, O. Corriol, V. Colomb, S. Bénazeth, *J. Trace Microprobe Techn.*, 2000, **18**, 511-516, Informa UK (Marcel Dekker).
- [196] E. Y. Bonnist, P. D. Pudney, L. A. Weddell, J. Campbell, F. L. Baines, S. E. Paterson, J. R. Matheson, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2014, **36**, 347-354.
- [197] K. Müller, E. Valentine-Thon, *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2006, **27**, 31-35.
- [198] S. G. Han, B. Newsome, B. Hennig, *Toxicology*, 2013, **306**, 1-8.
- [199] T. Wu, M. Tang, *Nanomedicine (Lond.)*, 2018, **13**, 233-249.
- [200] P. J. Caspers, G. W. Lucassen, R. Wolthuis, H. A. Bruining, G. J. Puppels, *Biospectroscopy*, 1998, **4**, S31-S39.
- [201] H. Lui, J. Zhao, D. McLean, H. Zeng, *Cancer Res.*, 2012, **72**, 2491-2500.
- [202] C. A. Lieber, S. K. Majumder, D. L. Ellis, D. D. Billheimer, A. Mahadevan-Jansen, *Lasers Surg. Med.*, 2008, **40**, 461-467.
- [203] P. J. Caspers, G. W. Lucassen, G. J. Puppels, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 572-580.
- [204] A. P. M. Michel, S. Liakat, K. Bors, C. F. Gmach, *Biomed. Opt. Express*, 2013, **4**, 520-530.
- [205] A. Bauer, O. Hertzberg, A. Küderle, D. Strobel, M. A. Pleitez, W. Mäntele, *J. Biophoton.*, 2018, **11**, article no. e201600261.
- [206] D. A. Bradley, M. J. Farquharson, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2000, **244**, 213-217.
- [207] H. Shehab, E. D. Desouza, J. O'Meara, A. Pejović-Milić, D. R. Chettle, D. E. B. Fleming, F. E. McNeill, *Physiol. Meas.*, 2016, **37**, 145-161.
- [208] F. Fercher, *J. Biomed. Opt.*, 1996, **1**, 157-173.
- [209] Gh. Podoleanu, *J. Microsc.*, 2012, **247**, 209-219.
- [210] M. Zysk, F. T. Nguyen, A. L. Oldenburg, D. L. Marks, S. A. Boppart, *J. Biomed. Opt.*, 2007, **12**, article no. 051403.
- [211] J. S. Schuman, C. A. Puliafito, J. G. Fujimoto, J. S. Duker, *Optical Coherence Tomography of Ocular Diseases*, 3rd ed., Slack Inc., Thorofare, NJ, 2013.
- [212] H. G. Bezerra, M. A. Costa, G. Guagliumi, A. M. Rollins, D. I. Simon, *JACC Cardiovasc. Interv.*, 2009, **2**, 1035-1046.
- [213] D. C. Adler, Y. Chen, R. Huber, J. Schmitt, J. Connolly, J. G. Fujimoto, *Nat. Photon.*, 2007, **1**, 709-716.
- [214] X. Yu, Q. Ding, C. Hu, G. Mu, Y. Deng, Y. Luo, Z. Yuan, H. Yu, L. Liu, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, 2019, **25**, 1-8.
- [215] J. Men, Y. Huang, J. Solanki, X. Zeng, A. Alex, J. Jerwick, Z. Zhan, R. E. Tanzi, A. Li, C. Zhou, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, 2016, **22**, article no. 6803213.
- [216] Y. Fan, Y. Xia, X. Zhang, Y. Sun, J. Tang, L. Zhang, H. Liao, *Biosci. Trends*, 2018, **18**, 12-23.
- [217] A. Levine, K. Wang, O. Markowitz, *Dermatol. Clin.*, 2017, **35**, 465-488.
- [218] A. Dubois, O. Levecq, H. Azimani, D. Siret, A. Barut, M. Suppa, V. Del Marmol, J. Malveyh, E. Cinotti, J. L. Perrot, *J. Biomed. Opt.*, 2018, **23**, article no. 106007.
- [219] G. Pothier Bouchard, S. M. Mentzer, J. Riel-Salvatore, J. Hodgkins, Ch. E. Miller, F. Negrino, R. Wogelius, M. Buckley, *J. Archaeol. Sci. Rep.*, 2019, **26**, article no. 101862.
- [220] S. Bertazzo, E. Gentleman, *Eur. Heart J.*, 2017, **38**, 1189-1193.
- [221] J. D. Hutcheson, C. Goettisch, S. Bertazzo, N. Maldonado, J. L. Ruiz, W. Goh, K. Yabusaki, T. Fais, C. Bouten, G. Franck, Th. Quillard, P. Libby, M. Aikawa, S. Weinbaum, E. Aikawa, *Nat. Mater.*, 2016, **15**, 335-343.
- [222] C. Verrier, D. Bazin, L. Huguet, O. Stéphan, A. Gloter, M.-Ch. Verpont, V. Frochot, J.-Ph. Haymann, I. Brocheriou, O. Traxer, M. Daudon, E. Letavernier, *J. Urol.*, 2016, **196**, 1566-1574.
- [223] M. A. Aronova, R. D. Leapman, *MRS Bull.*, 2012, **37**, 53-62.
- [224] C. Gay, E. Letavernier, M.-Ch. Verpont, M. Walls, D. Bazin, M. Daudon, N. Nassif, O. Stephan, M. de Frutos, *ACS Nano.*, 2020, **14**, 1823-1836.
- [225] A. Dazzi, F. Glotin, R. Carminati, *J. Appl. Phys.*, 2010, **107**, article no. 124519.
- [226] A. Dazzi, C. B. Prater, *Chem. Rev.*, 2017, **17**, 5146-5173.
- [227] E. Esteve, Y. Luque, J. Waeytens, D. Bazin, L. Mesnard, Ch. Jouanneau, P. Ronco, A. Dazzi, M. Daudon, A. Deniset-Besseau, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 7388-7392.
- [228] D. Bazin, M. Rabant, J. Mathurin, M. Petay, A. Deniset-Besseau, A. Dazzi, Y. Su, E. P. Hessou, F. Tielens, F. Borondics,

- M. Livrozet, E. Boudelicque, J.-Ph. Haymann, E. Letavernier, V. Frochot, M. Daudon, *C. R. Chim.*, 2022, **25**, 1-14.
- [229] F. Jamme, S. Villette, A. Giuliani, V. Rouam, F. Wien, B. Lagarde, M. Réfrégiers, *Microsc. Microanal.*, 2010, **16**, 507-514.
- [230] E. Batard, F. Jamme, S. Villette, C. Jacqueline, M.-F. de la Cochetière, J. Caillon, M. Réfrégiers, *PLoS One*, 2011, **6**, article no. 19440.
- [231] F. Jamme, S. Kascakova, S. Villette, F. Allouche, S. Pallu, V. Rouam, M. Réfrégiers, *Biol. Cell*, 2013, **105**, 277-288.
- [232] M. Strupler, M. Hernest, C. Fligny, J.-L. Martin, P.-L. Tharaux, M.-C. Schanne-Klein, *J. Biomed. Opt.*, 2008, **13**, article no. 054041.
- [233] N. Vuillemin, P. Mahou, D. Débarre, Th. Gacoin, P.-L. Tharaux, M.-C. Schanne-Klein, W. Supatto, E. Beaurepaire, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, article no. 29863.
- [234] A.-M. Pena, Th. Boulesteix, Th. Dartigalongue, M.-C. Schanne-Klein, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 10314-10322.
- [235] K. Benzerara, F. Skouri-Panet, J. Li, C. Férard, M. Gugger, Th. Laurent, E. Couradeau, M. Ragon, J. Cosmidis, N. Menguy, I. Margaret-Oliver, R. Taver, P. López-García, D. Moreira, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, **111**, 10933-10938.
- [236] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev. B*, 1964, **136**, 864-871.
- [237] R. O. Jones, *Rev. Mod. Phys.*, 2015, **87**, 897-923.
- [238] N. Mardirossian, M. Head-Gordon, *Mol. Phys.*, 2017, **115**, 2315-2372.
- [239] M. Cutini, M. Corno, D. Costa, P. Ugliengo, *J. Phys. Chem. C*, 2019, **123**, 7540-7550.
- [240] M. Corno, C. Busco, V. Bolis, S. Tosoni, P. Ugliengo, *Langmuir*, 2009, **25**, 2188-2198.
- [241] A. Rimola, M. Aschi, R. Orlando, P. Ugliengo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 10899-10910.
- [242] D. Bazin, F. Tielens, *Appl. Catal.*, 2015, **504**, 631-641.
- [243] F. Tielens, D. Bazin, *C. R. Chim.*, 2018, **21**, 174-181.
- [244] I. C. Oğuz, H. Guesmi, D. Bazin, F. Tielens, *J. Phys. Chem. C*, 2019, **123**, 20314-20318.

III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1) Apport des techniques utilisées dans la compréhension de la physiogénèse des calcifications cutanées

a) *Aspect structural*

Dans diverses dermatoses étudiées (calciphylaxie, syndrome de Lyell, pseudoxanthome élastique et ulcère de jambe calcifié) nous avons pu observer un phénomène similaire : les plus volumineuses calcifications semblent composées du regroupement et de la coalescence de calcifications sphériques nanométriques (Figure 11).

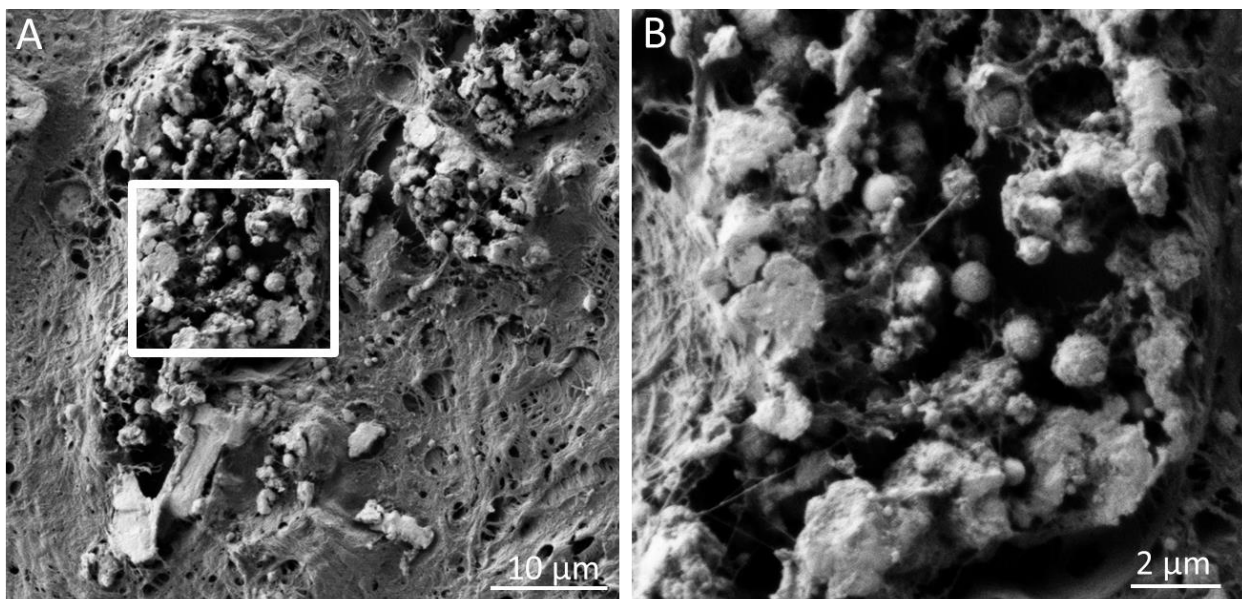


Figure 11. Aspect ultra-structural des calcifications cutanées en MEB, exemple du pseudoxanthome élastique. A. calcifications dermiques constituées de sphérules et de plaques. B. Grossissement de la zone blanche rectangulaire du panel A, montrant l'agglomération de sphérules en plaques.

Cet aspect est similairement observé dans des calcifications survenant d'autres tissus, comme dans les calcifications associées au cancer du sein ¹³¹. Ces éléments suggèrent un mécanisme de genèse au moins partiellement similaire, quel que soit le type de calcifications cutanées (métastatiques ou dystrophiques) mais aussi l'environnement tissulaire. Cependant il convient de regarder plus en détail la structure, en particulier interne, de ces sphérules avant de conclure à des phénomènes de genèses strictement similaire.

Ainsi, nous avons pu observer en MEB quelques-unes de ces sphérules alors qu'elles étaient sectionnées, et elles semblent elles-mêmes formées d'un regroupement de sphères d'encore plus petite taille (Figure 12D). Des aspects différents ont été observés sur des sphérules calciques sectionnées au cours de cancer du sein, avec un aspect de stries radiées, de couches concentriques ou de l'association des deux (Figure 12) ¹³¹. Ces différences subtiles pourraient correspondre à une physio genèse différentes.

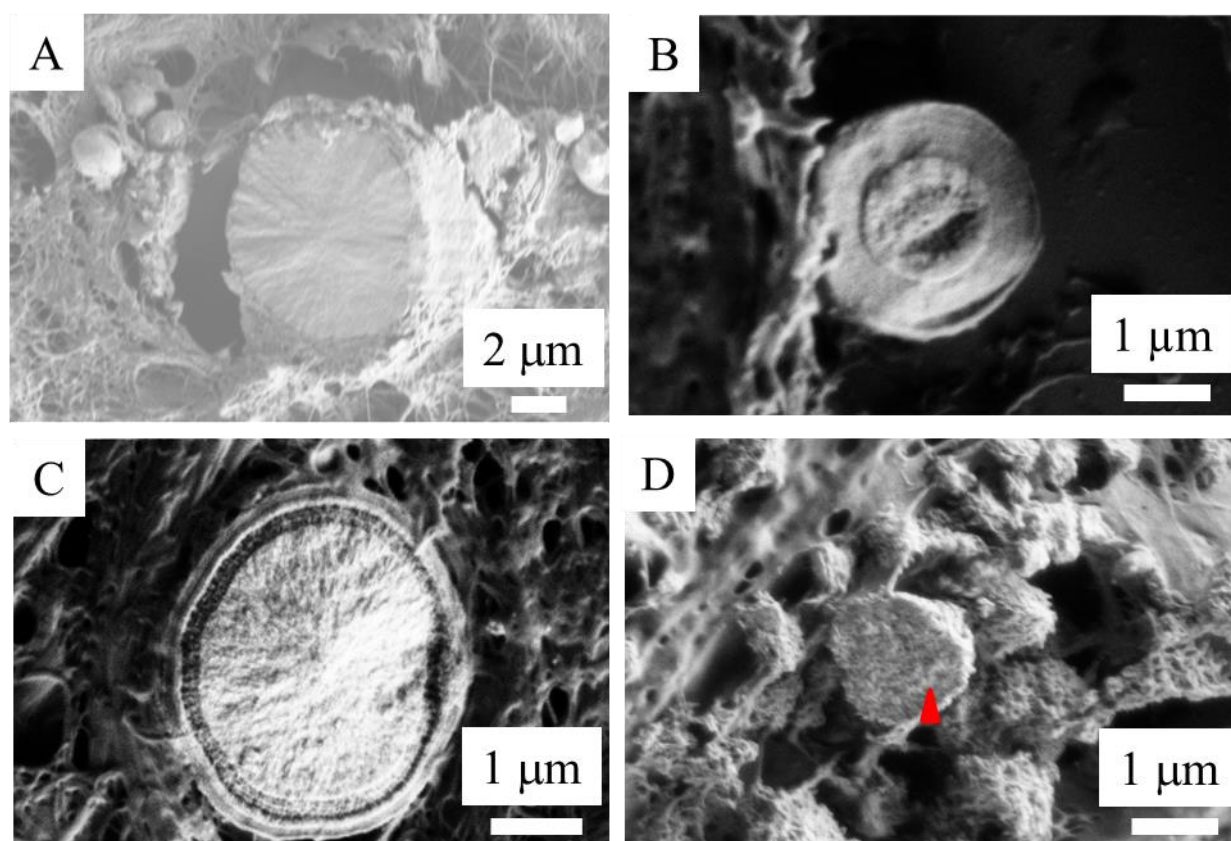


Figure 12. Les calcifications sphériques peuvent afficher différentes structures internes : (A) Stries radiées ; (B) : Couches concentriques ; (C) : Stries radiées et couches concentriques (images A à C : calcifications tissulaires au cours du cancer du sein). (D) Calcifications cutanées au cours du syndrome de Lyell ; les sphères semblent résulter d'une agglomération de nano-sphères (flèches rouges).

En outre, grâce à l'analyse structurale de haute résolution qu'elle offre, la MEB nous a également permis, dans les calcifications cutanées sur ulcère de jambe, d'identifier des cavités et un réseau sur la surface des calcifications, dont l'aspect est compatible avec des empreintes bactériennes et un biofilm « empierré ». Cette observation a déjà été faite au cours des lithiases

urinaires, suggérant l'existence de mécanisme de physio genèse similaires et indépendants quel que soit l'organe, son fonctionnement, son environnement calcique ou son pH.

Un autre aspect intéressant est que la structure de la calcification n'est pas prédictive de sa composition chimique. Ainsi, dans nos études, les sphérules nanométriques observées peuvent ainsi être composées de calcite ou de carapatite. Des contraintes mécaniques, liés à l'environnement cutané, pourraient en partie expliquer cet aspect. Cependant, ces sphérules étant identifiées à la fois dans les parois des vaisseaux mais aussi dans différentes zones du tissu interstitiel (fibres dermiques, péri adipocytaires...), la compréhension de cet aspect reste incomplète.

Par ailleurs, la MEB ne nous a pas apporté pas uniquement des informations sur la structure des calcifications mais également sur l'environnement tissulaire dans lequel celles-ci se sont formées. Ainsi, dans la calciphylaxie, nous avons pu observer que les calcifications se localisaient parfois sur des fibres dermiques prenant un aspect rectiligne et fragmenté (Figure 13A et B). Par ailleurs, au cours de l'étude de cas de pseudoxanthome élastique comme dans certains cas de calcifications sur syndrome de Lyell, nous avons pu observer un fin réseau de fibrilles entremêlées autour des plaques calcifiées, dont l'aspect était évocateur de réticuline (Figure 13C et D).

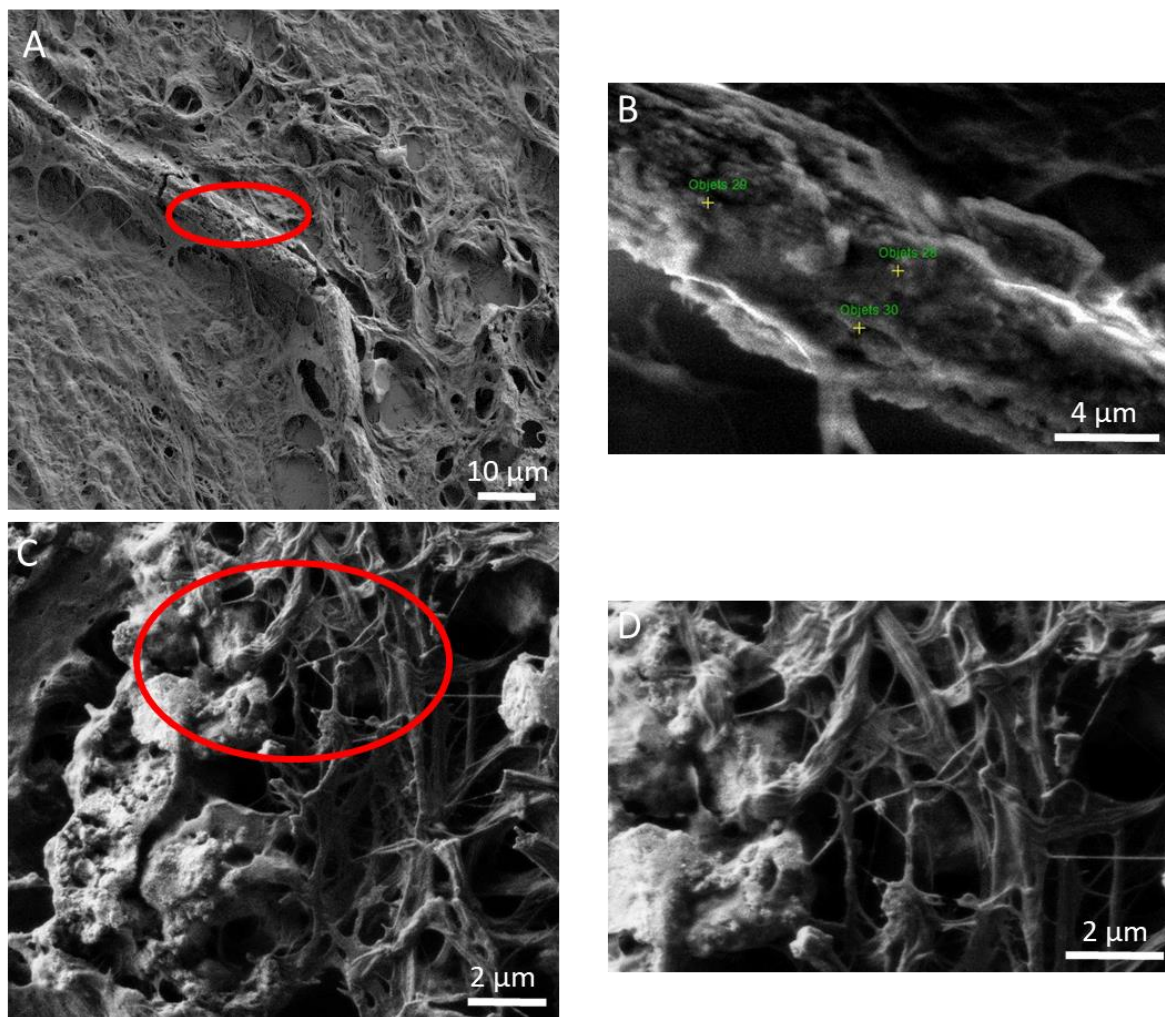


Figure 13. Images de MEB montrant l'aspect tissulaire dermique environnant les calcifications cutanées au cours de la calciphylaxie urémique (A et B) et du pseudoxanthome élastique (C et D). A. Fibre dermique rectiligne et fragmentée au cours de la calciphylaxie urémique. B. A plus fort grossissement (ovale rouge du panel A), on visualise de multiples sphérules, recouvrant la surface de la fibre dermique, dont la nature phosphocalcique a été confirmée par EDX. C. Calcifications dermiques (tête de flèche). D. A plus fort grossissement (ovale rouge du panel C), on visualise un réseau fin de fibre correspondant à de la réticuline (collagène III), normalement absente dans le derme (présence de réticuline confirmée par coloration spécifique).

Les clichés de la figure 13 montrent toutefois l'une des limites de la MEB. Bien que l'on puisse suspecter que la fibre sur les clichés 13A et B soit une fibre élastique, et que le fin réseau en périphérie des calcifications soit de la réticuline, cette information doit être confirmée par des colorations histologiques spécifiques.

Celle-ci a pu être réalisée pour affirmer la présence de réticuline autour des calcifications dans un cas de pseudoxanthome élastique (Figure 14), confirmant la présence de ce type de collagène, usuellement présent dans la peau uniquement dans la jonction dermo-épidermique et dont la présence ectopique a déjà été montrée au cours du pseudoxanthome élastiques¹²⁴.

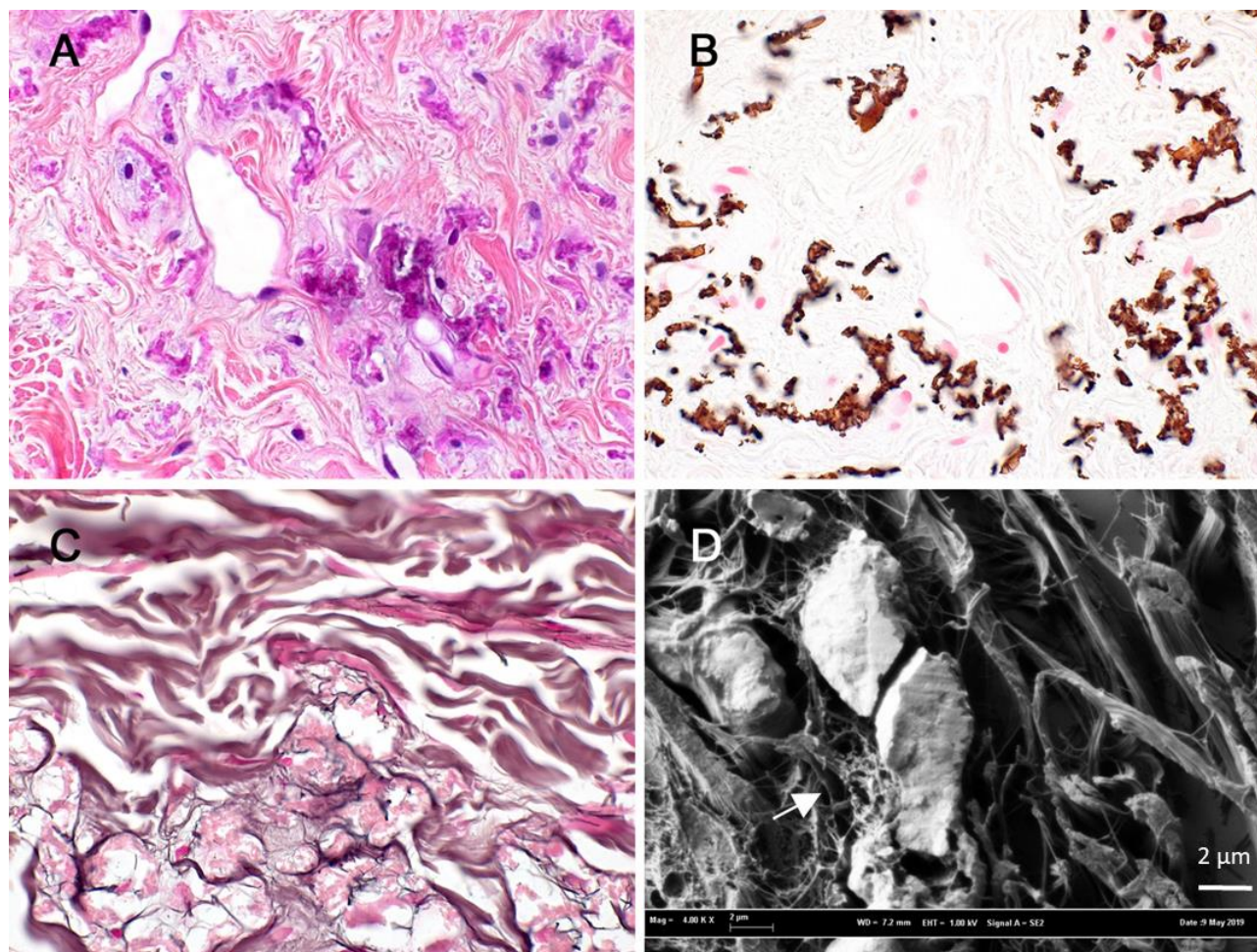


Figure 14. A : HES x400, fibres élastiques elastorrhexiques. B : Von Kossa x400, calcifications dermiques. C : Coloration réticuline x400, réticuline (noir) entourant des fibres élastiques calcifiées. D : MEB, calcifications entourées de réticuline (flèche).

De façon assez étonnante, ces modifications tissulaires, satellites de calcifications, sont peu explorées. Il est pourtant légitime de s'interroger sur leur rôle dans l'expression symptomatologique de la maladie, mais aussi sur leur rôle dans la genèse des calcifications.

Enfin, la MEB nous a également permis de déterminer la localisation subcellulaire précise des calcifications, information partiellement disponible en microscopie optique. Ainsi sur la figure 15A on observe en microscopie optique des calcifications vasculaires ; les clichés obtenus en MEB (Figure 15B) apportent des informations beaucoup plus précises, révélant que ces

calcifications correspondent à des sphérules, se situant dans la paroi du vaisseau, immédiatement sous l'endothélium.

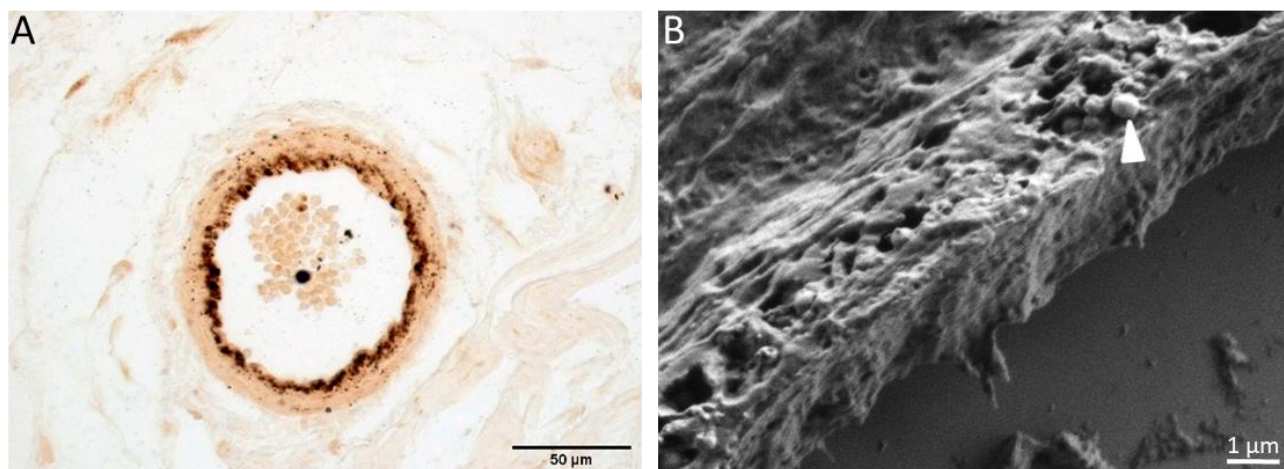


Figure 15. Localisation subcellulaire des calcifications cutanées, corrélation en microscopie optique (coloration de Yasue) et MEB. A. et B. Médiacalcose, C. et D. Calciphylaxie urémique. A. La coloration de Yasue montre la présence de calcifications dans la paroi d'un capillaire dermique. B. La MEB identifie de multiples sphérules nanométriques sous l'endothélium capillaire.

b) Aspect chimique

Dans la quasi-totalité des échantillons analysés nous avons identifié la présence de carboxapatite. Ces résultats sont comparables aux différentes analyses chimiques rapportées dans la littérature ¹²⁴⁻¹²⁶.

Nous avons également souvent identifié la présence de phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC), correspondant à un phosphate de calcium non cristallin et non stœchiométrique ¹⁸. Enfin, dans le cas de la sarcoïdose uniquement, les calcifications cutanées étaient composées de calcite (un des polymorphes de CaCO_3) ¹³².

Cette différence chimique conduit là encore à s'interroger sur la physiogénèse, possiblement différentes, de ces calcifications. L'un des éléments pouvant entrer en jeu dans cette différence pourrait être les modifications tissulaires spécifiques engendrées par la sarcoïdose. Ainsi, la formation de granulomes correspondant à un conglomérat compact de cellules épithélioïdes et multi nucléées géantes encerclées de lymphocytes, (lymphocytes T CD4, CD8 et lymphocytes

B) ¹³³ entraînent de grandes modifications architecturales tissulaires, mais aussi d'environnement chimique tissulaire, avec production par ces granulomes de calcitriol ¹³⁴ et une possible modification de gradient calcique. Une telle réorganisation peut conduire à une pathogenèse spécifique de la calcification dans la sarcoïdose, expliquant la présence de calcite et non de carbapatite.

De façon assez remarquable, et en dehors des calcifications en périphérie des granulomes sarcoïdiques, nous n'avons pas remarqué de différence de composition chimique en fonction de la localisation des calcifications. Ainsi, la présence de carbapatite et de PACC était identifiée de façon indifférente dans les parois vasculaires, dans le derme, en périphérie des adipocytes... Ces résultats suggèrent donc une contribution modeste de l'environnement tissulaire cutané à la composition des calcifications.

Une étude conduite les lithiases urinaires a montré que la présence de PACC était plus souvent associée à des lithiases d'origine infectieuse ¹¹⁷. Nous avons également identifié la présence de PACC dans les calcifications sur ulcères de jambe colonisés à *Pseudomonas Aeruginosa*, allant dans le sens de cette étude. Toutefois, afin d'explorer le rôle des infections dans la genèse des calcifications cutanées, il serait intéressant, par exemple, de comparer le taux de PACC et de carbonatation de l'apatite dans les calcifications sur ulcère de jambe avec celui observé dans les calcifications cutanées a priori non liées à des phénomènes infectieux (comme au cours de la calciphylaxie).

2) Apport des techniques utilisées dans l'élaboration de pistes thérapeutiques

Les différents résultats obtenus permettent d'apporter plusieurs éléments de réflexion sur les thérapeutiques actuelles et envisageables dans la prise en charge de ces calcifications cutanées.

a) Considération sur les thérapeutiques existantes

Certains auteurs suggèrent que l'efficacité du thiosulfate dans le traitement de la calciphylaxie reposerait, entre autre, sur son effet vasodilatateur ¹³⁵. Nos résultats interrogent sur cette approche thérapeutique. En effet, les clichés obtenus en MEB montrent des calcifications de la paroi des vaisseaux tellement massives qu'il semble impossible que ce type de traitement puisse apporter un réel bénéfice. Dans ce cadre, l'utilisation de bisphosphonate ou de thiosulfate

semble une approche plus pertinente, permettant de surcroît également une approche thérapeutique des calcifications interstitielles.

b) Pistes thérapeutiques envisagées

Notre étude portant sur les calcifications cutanées sur ulcère de jambe suggère fortement la présence d'un lien entre infection bactérienne et formation de ces calcifications cutanées. Dans ce cadre, une approche antibactérienne pourrait être envisagée dans la prévention de la formation de ces calcifications, mais aussi d'autres dermatoses calcifiantes. Ainsi, bien que le rôle des agents infectieux semble peu probable dans certaines des dermatoses que nous avons étudiées, comme la calciphylaxie, celui-ci est loin d'être exclu dans d'autre, comme dans nos cas de calcifications cutanées sur syndrome de Lyell.

Ces calcifications sur syndrome de Lyell soulignent d'ailleurs un autre aspect, qui est le rôle de divers traitements dans la survenue de ces calcifications. L'analyse de ces cas nous a conduits à suspecter le rôle de la Caspofungine ; cette suspicion a été étayée par des données de la littérature suggérant un rôle pro-calcifiant de ce traitement. De même, la compréhension récente des protéines de régulation de la formation des calcifications a conduit à identifier les anti vitamines K comme thérapeutique favorisant la survenue de la calciphylaxie. Il n'est pas exclu que d'autres thérapeutiques soient également pro-calcifiantes, sans que celles-ci soient pour autant clairement identifiées à ce jour. Dans ce cadre, l'utilisation de toutes thérapeutiques, dont les propriétés pro-calcifiantes sont connues ou non, doivent être réfléchies chez un patient présentant une dermatose calcifiante.

Par ailleurs, en suggérant un lien entre insuffisance veineuse chronique et calcifications sur ulcère de jambe d'une part et nécrolyse épidermique et calcifications dermiques superficielles d'autre part, cette thèse renforce la suspicion de lien entre inflammation et calcifications, supportée par de nombreux auteurs. Ces résultats laissent espérer l'efficacité de traitements anti-inflammatoires, comme les antis TNF-alpha ou les immunoglobulines intraveineuses. Ces traitements ont été utilisés par certains auteurs au cours de calcifications dystrophiques sur dermatomyosite ou sclérodermie systémique ^{136,137}. Toutefois ces études ont été conduites sur un nombre relativement limité de patients, et de plus amples études seraient nécessaires.

Enfin, nos travaux ont souligné les conséquences des calcifications cutanées, et montré que celles-ci ne sont nullement des dépôts inertes sans conséquence, pourvoyeur entre autre de plaies ou de retard de cicatrisation. De telles conséquences éclairent sur l'importance de la prise en charge thérapeutique de ces dépôts et non pas uniquement des pathologies dermatologiques qui leur sont associées. De surcroit, outre ces manifestations cliniques, conséquences évidentes des calcifications, nous ne pouvons exclure l'existence de conséquences pathologiques autres. Ce propos peut être illustré par les conséquences des dépôts pathologiques urinaires sur le fonctionnement rénal. L'obstruction urétérale causée par des lithiases peut ainsi causer une insuffisance rénale dans un contexte clinique généralement assez « bruyant » (comparable en cela aux plaies induites par les calcifications cutanées), mais la précipitation intra-tubulaire rénale de micro-cristaux peut également altérer le fonctionnement rénal et conduire là aussi à une insuffisance rénale. Aux altérations tissulaires causées par la présence de ces dépôts pathologiques s'ajoute certainement des altérations induites par l'inflammation réactionnelle à ces dépôts, l'ensemble contribuant au dysfonctionnement et à la perte d'homéostasie de l'organe.

3) Limites

Certaines limites techniques sont à souligner. Tout d'abord, le repérage des zones d'intérêt est parfois difficile sur les lames MIRR car les préparations ne peuvent pas être colorées. Par ailleurs, au moment même de l'analyse, la zone d'intérêt n'est pas toujours retrouvée avec facilité, malgré le repérage préalable en microscopie optique, car la lecture des lames MIRR sur microscope infrarouge ou MEB n'est pas de même type que celle en microscopie optique.

De plus, ces analyses nécessitant un étalement sur lame spécifique, le bloc est systématiquement recoupé : d'un niveau de coupe à l'autre, le tissu et les dépôts recherchés sont bien entendu différents. Certains dépôts observés sur les lames de microscopie optique n'ont ainsi pas été retrouvés sur les lames MIRR. Il est aussi probable, notamment concernant les cas de sarcoïdose, que sur des zones de biopsie, non coupées et donc non analysées, des dépôts pathologiques puissent être présents, soulignant l'intérêt de développer des techniques permettant l'analyse des blocs de biopsie dans leur totalité. Enfin, la coupe des blocs elle-même modifie sans nul doute, au moins en partie, la morphologie des dépôts.

Ces limites peuvent être dépassées par l'utilisation d'outils permettant une analyse de l'ensemble du bloc paraffiné contenant la biopsie cutanée. Nous avons utilisé cette approche avec succès au Synchrotron Soleil (ligne Diffabs) dans le cadre de l'étude de réactions cutanées sur tatouage (cf publication en annexe).

4) Perspectives

a) Microscopie multiphoton

Les descriptions structurales et chimiques que nous avons apportées sur ces diverses dermatoses sont novatrices, mais ne permettent pas de répondre à l'ensemble des questions qui se posent autour de ces dépôts calciques : pourquoi certains patients, qui présentent un bilan phosphocalcique normal, ont des calcifications cutanées massives ? Pourquoi au contraire, d'autre patient, comme certains patients dialysés, présentent des bilans phosphocalciques extrêmement perturbés, mais aucune calcification cutanée ? Ce paradoxe soulève l'hypothèse d'altérations tissulaires spécifiques des fibres élastiques dermiques et vasculaires, favorisant la précipitation des dépôts phosphocalciques chez certains patients. Ces altérations pourraient être la conséquence de phénomènes inflammatoires cutanés, comme évoqué dans l'introduction.

L'exploration de cette hypothèse nécessite l'utilisation d'un outil permettant d'une part de distinguer facilement les fibres élastiques dermiques des autres fibres (exercice très difficile avec la MEB, comme expliqué plus haut), d'autre part qui bénéficie d'une haute résolution et enfin qui permet de réaliser une analyse rigoureuse quantitative de la structure des fibres. Pour répondre à ces exigences, nous avons utilisé la microscopie multiphoton, outil disponible au Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB) à l'Ecole Polytechnique.

La microscopie multiphoton est apparue au début des années 90. Cette technique a été développée comme une alternative à la microscopie confocale, permettant d'améliorer l'imagerie en profondeur des tissus biologiques. Il repose sur l'utilisation d'une excitation dans le rouge-proche infrarouge, typiquement 700-1200 nm, permettant d'imager un tissu tel que la peau jusqu'à une profondeur de quelques centaines de microns, avec une résolution sub-micrométrique¹³⁸⁻¹⁴².

La microscopie multiphoton présente plusieurs modes de contrastes utilisables en parallèle et sans marquage. Ceci permet d'identifier des éléments constitutifs des tissus sans utiliser de

colorants ou de protéines fluorescentes ajoutés artificiellement, par exemple le collagène fibrillaire par le contraste dit « SHG » (génération de seconde harmonique) et l'élastine par sa fluorescence intrinsèque (Figure 16). Il est alors possible d'imager en profondeur un tissu intact, sans coloration, en visualisant de manière spécifique ses diverses composantes ¹⁴³.

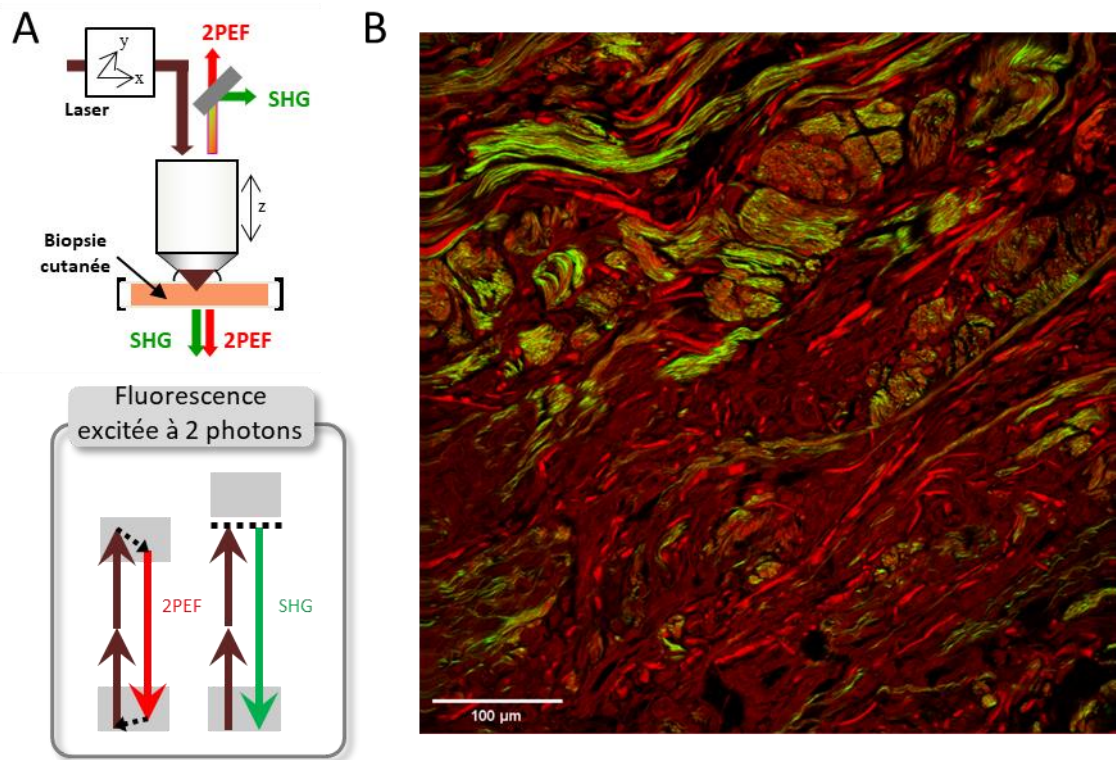


Figure 16. Imagerie multiphoton de la peau humaine. A. Schéma du microscope multiphoton. B. Image multiphoton, biopsie cutanée dans le cadre d'une calciphylaxie, derme moyen : le signal 2PEF (fluorescence excitée à 2 photons, en rouge) permet de visualiser les fibres élastiques du derme, apparaissant ici rectilignes et fragmentées ; le signal SHG (génération de second harmonique, en vert) permet de visualiser les fibres de collagène du derme.

A partir de ces images, des analyses quantitatives rigoureuses peuvent ensuite être réalisées. Ceci se fait à l'aide de logiciel d'apprentissage automatique (type Ilastik), après segmentation des fibres à étudier, et permet d'étudier de multiples paramètres structuraux, comme la longueur des fibres, leur angulation, leur excentricité ¹⁴⁴ (Figure 17) ...

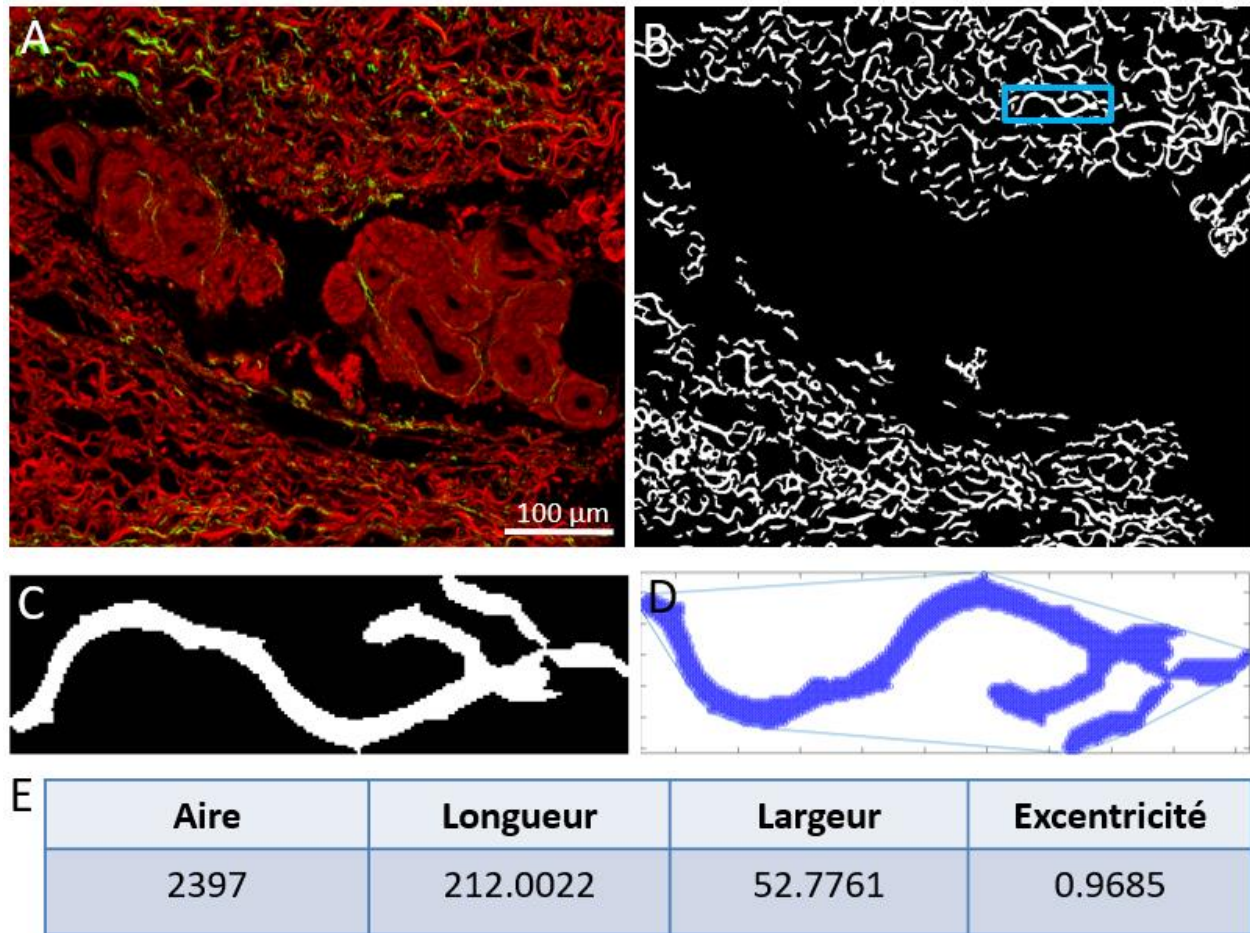


Figure 17. Segmentation des fibres élastiques dermiques et analyse quantitative. A. Image multiphoton. B. Image après segmentation des fibres élastiques. C. Agrandissement de la fibre élastique encadrée sur l'image précédente. D. Représentation de cette même fibre en vue de l'analyse structurale. E. Exemples de paramètre pouvant être analysés avec leur valeur pour la fibre étudiée ici.

Utilisée dans plusieurs études sur la peau, la microscopie multiphoton a montré son intérêt dans la caractérisation des fibres dermiques, en particulier des fibres d'élastine et de collagène, mais aussi dans l'étude structurale de celles-ci et de leur possible altération. Elle a ainsi été appliquée à l'étude du vieillissement cutané, mais aussi des pathologies entraînant une altération des fibres dermiques, comme le pseudoxanthome élastique ou la maladie de Marfan ¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

De premiers résultats ont été obtenus en appliquant cette technique à la calciphylaxie urémique. Nous avons ainsi étudié 14 biopsies cutanées de patients atteints de calciphylaxie et de 12 témoins présentant une insuffisance rénale sans calciphylaxie. Les patients des deux groupes

présentaient des facteurs de risque de développer une calciphylaxie comparable (en particulier en termes de produit phosphocalcique).

Nous avons observé que les fibres élastiques au cours de la calciphylaxie étaient statistiquement plus rectilignes que dans les contrôles. En outre, seules les calcifications massives et circonférentielles dans les vaisseaux de petite taille étaient spécifiques des cas de calciphylaxie. Les témoins présentaient, tout comme les cas de calciphylaxie, de nombreuses calcifications interstitielles, surlignant la non spécificité de celles-ci, contrairement aux modifications structurelles des fibres élastiques. Ces résultats abondent dans le sens de notre hypothèse d'altérations tissulaires spécifiques des fibres élastiques dermiques et vasculaires, favorisant potentiellement, à facteur de risque similaires, la précipitation des dépôts phosphocalciques chez certains patients.

L'origine exacte de cet aspect rectiligne reste toutefois à explorer. Si des altérations des fibres élastiques, causées par les MMP⁸⁰⁻⁸² (comme précédemment décrit) sont souvent évoquées dans la littérature, les images de nano sphères phosphocalciques que nous avons observées sur la surface des fibres élastiques interrogent sur la chronologie des faits. Nous ne pouvons ainsi pas exclure que des dépôts nanométriques se forment dans un premier temps sur les fibres élastiques, causant, dans un deuxième temps, leur modification structurelle, et favorisant enfin dans un troisième temps la formation de dépôts phosphocalciques plus massifs.

En outre, il est intéressant de surligner que la formation de calcifications sur les fibres élastiques n'est pas associée uniquement à un aspect rectiligne des fibres. En effet, au cours du pseudoxanthome élastique par exemple, les fibres élastiques sont au contraire pelotonnées. Certains auteurs rapportent d'ailleurs un aspect similaire en microscopie optique au cours de la calciphylaxie¹⁴⁸.

Comme abordé dans l'introduction, la formation de calcifications cutanées est la conséquence de phénomènes multiples. Au sein des calcifications dites dystrophiques, il est probable que cette complexité soit également, entraînant différents types d'altération des fibres au cours de différentes dermatoses, conduisant dans tous les cas à la formation de dépôts phosphocalciques. D'autres études sur biopsies cutanées de pseudoxanthome élastique sont en cours pour explorer cette hypothèse et mieux comprendre ces premiers résultats.

b) Techniques de caractérisation physico-chimique in vivo

La caractérisation in vivo est une approche prometteuse pour le clinicien. Parmi les techniques de caractérisation physico-chimique capables de collecter des données sur la peau in vivo, citons la spectroscopie Raman ¹⁴⁹, FT-IR ¹⁵⁰, la fluorescence X ¹⁵¹ et la tomographie par cohérence optique (OCT).

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'en tester deux : l'OCT dans la sarcoïdose, détaillé ci-dessous, et la spectroscopie FT-IR sur tatouages (détail en annexe).

L'OCT est une technologie basée sur l'interférométrie optique à faible cohérence pour imager les tissus biologiques avec une résolution spatiale à l'échelle du micromètre ¹⁵². Elle est couramment utilisée dans plusieurs domaines médicaux, comme en ophtalmologie pour obtenir des images de la rétine et du segment antérieur de l'œil ¹⁵³, en cardiologie interventionnelle ¹⁵⁴ et en gastro-entérologie ¹⁵⁵. En dermatologie, cet outil n'est pas utilisé en routine, mais il semble prometteur, comme l'atteste des publications montrant son intérêt dans l'aide au diagnostic clinique de lésions cutanées cancéreuses ou non, permettant d'éviter dans certains cas la biopsie ou exérèse cutanée ^{156,157}. L'OCT permet en effet une bonne visualisation des structures cellulaires épidermiques et dermiques, permettant de les visualiser sur une profondeur de 500 μm ¹⁵⁷.

Nous avons eu l'opportunité de tester l'OCT sur une biopsie de sarcoïdose cutanée. Nous avons utilisé un dispositif OCT à source balayée disponible dans le commerce (Thorlabs, OCS1300SS) fonctionnant dans le proche infrarouge à une longueur d'onde centrale de 1300 nm, produisant des images avec une résolution spatiale de $12 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ (axial $\times$ transversal). La figure 18 montre un exemple d'image OCT obtenue, identifiant clairement la présence de multiples granulomes dans le derme. Bien que nos analyses aient été conduites à ce stade sur biopsie cutanée et non in vivo, elle montre que cette technique serait adaptée pour diagnostiquer la sarcoïdose cutanée in vivo, ce qui éviterait au patient d'avoir à subir une biopsie.

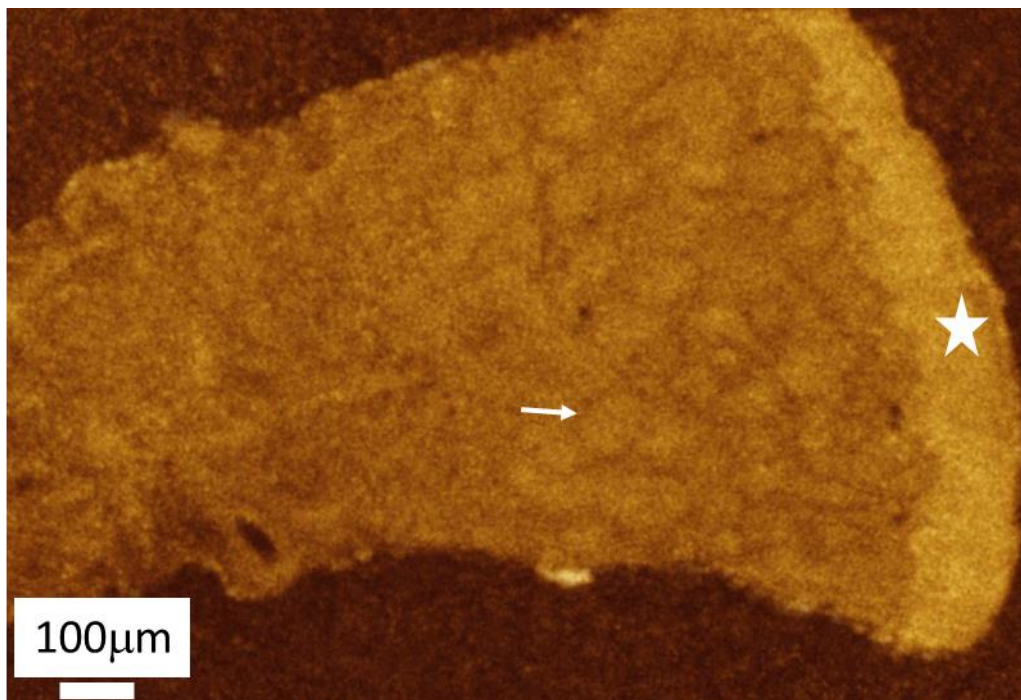


Figure 18. Analyse OCT dans la sarcoïdose cutanée : épiderme (étoile), derme contenant de nombreux granulomes dont on identifie la structure ovale (flèche).

IV. CONCLUSION

Ce travail de thèse présente différentes techniques physico-chimiques, englobant l'imagerie à l'échelle sub micrométrique par MEB couplé à l'EDX et l'identification chimique par deux spectroscopies vibrationnelles à savoir FT-IR et Raman. Il montre leur application à la caractérisation des dépôts cutanés endogènes et exogènes.

Outre un apport descriptif à la fois structurale et chimique, cette thèse apporte des éléments novateurs sur la physio genèse, les conséquences tissulaires et les pistes thérapeutiques de prise en charge de ces dépôts

L'analyse complète de nos résultats démontre que, bien que la carapatite soit l'espèce chimique la plus souvent identifiée dans les dépôts endogènes, d'autres composés chimiques peuvent être identifiés. Une telle diversité chimique suggère que la genèse de ces dépôts est le fruit de différents mécanismes chimiques. En outre, nous avons également démontré la variété structurale et de localisation tissulaire de ces dépôts.

Bien que ce manuscrit présente principalement la caractérisation des calcifications cutanées, il aborde également, par le biais de la sarcoïdose, les dépôts exogènes. D'autres analyses de ces dépôts exogènes, également réalisées pendant cette thèse, sont présentées en annexe et feront l'objet d'études ultérieures.

Enfin, d'autres outils seront utilisés dans les années qui viennent afin d'explorer de façon plus poussée la genèse et conséquence tissulaire de ces dépôts, par le biais notamment de la microscopie multiphoton et la ligne de lumière Nanoscopium permettant une imagerie 3D à l'échelle nanométrique.

ANNEXE

Dans cette thèse, nous avons vu l'utilisation de la spectroscopie FT-IR dans la caractérisation des dépôts endogènes calciques, mais aussi des dépôts exogènes de silice au cours de la sarcoïdose.

Cet outil pourrait également être utilisé dans l'étude *in vivo* d'autres dépôts exogènes. Ainsi, nous avons récemment testé l'acquisition de spectres FT-IR *in vivo* sur le tatouage d'un patient à l'aide d'un spectromètre FT-IR portable Agilent 4300. Le dispositif expérimental, couramment utilisé pour les archéo-matériaux, permet l'acquisition de spectres infrarouges dans la gamme 5000-650 cm^{-1} avec une résolution spectrale de 4 cm^{-1} . Les expériences ont été réalisées en mode réflexion totale atténuée (avec une profondeur de pénétration typique de 2 μm) en utilisant une fenêtre d'interface en diamant. Un ensemble de spectres infrarouges a été collecté (figure 19) : il est clair que le rapport signal sur bruit est excellent et il semble donc possible d'extraire des informations spectrales concernant la composition chimique des tatouages. Cette technique est donc prometteuse pour apporter, par exemple, une caractérisation chimique des composés présents au cours de réactions cutanées sur tatouage. Le patient pourrait ainsi être informé des potentiels allergènes responsable de ces lésions cutanées et éviter la réalisation de nouveaux tatouages avec des encres en contenant.

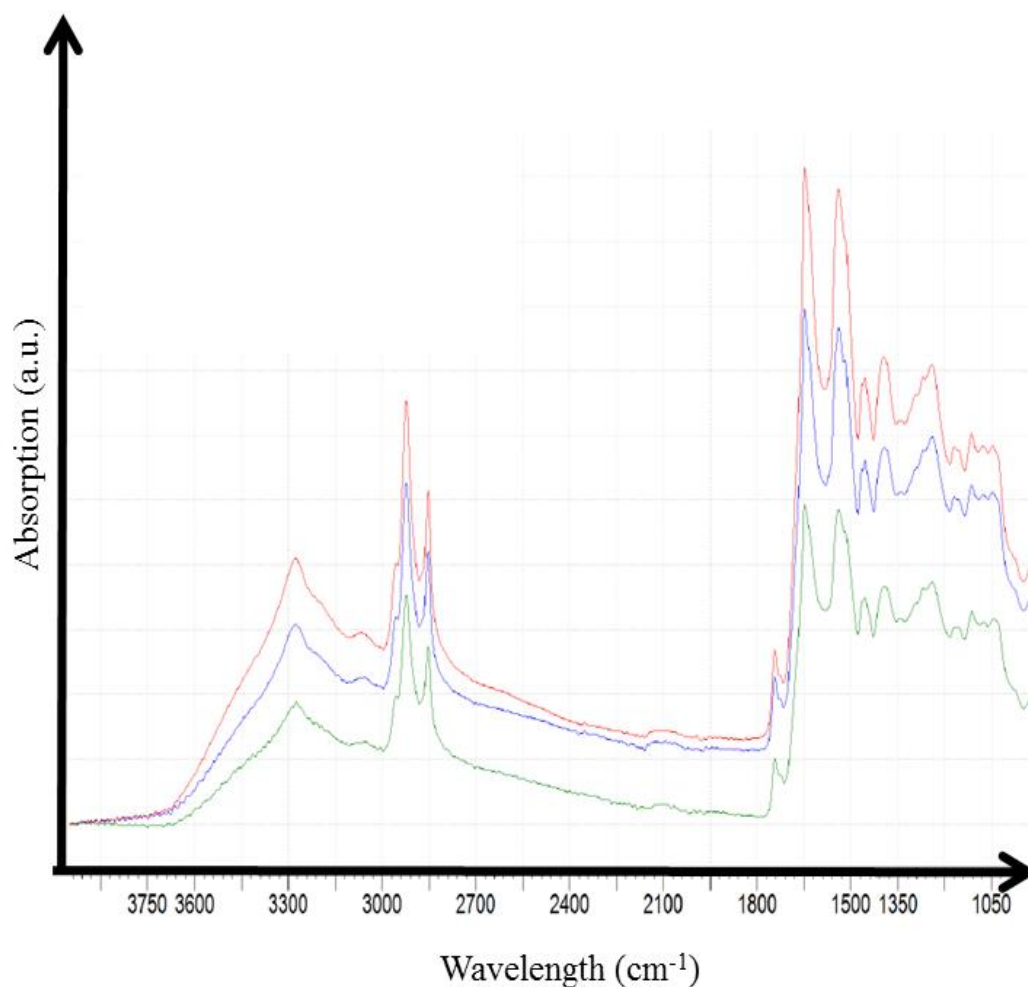


Figure 19. Spectres infrarouges in vivo d'un tatouage cutané acquis avec une configuration expérimentale infrarouge portable.

Notre travail de caractérisation de la composition chimique des encres de tatouage a aussi été réalisé, en utilisant le Synchrotron Soleil, dans trois cas de tumeurs cutanées (de type kératoacanthomes) développées sur tatouage. Ces résultats sont présentés dans la publication suivante.

*Correspondence: N. Belhomme. E-mail:

nicolas.belhomme@chu-rennes.fr

This manuscript has not been published elsewhere and is not currently under review in any other peer-reviewed media.

References

- 1 Barranco P, Phillips-Angles E, Dominguez-Ortega J, Quirce S. Dupilumab in the management of moderate-to-severe asthma: the data so far. *Ther Clin Risk Manag* 2017; **13**: 1139–1149.
- 2 Chopra A, Nautiyal A, Kalkanis A, Judson MA. Drug-induced sarcoidosis-like reactions. *Chest* 2018; **154**: 664–677.
- 3 Cohen Aubart F, Lhote R, Amoura A *et al.* Drug-induced sarcoidosis: an overview of the WHO pharmacovigilance database. *J Intern Med* 2019. <https://doi.org/10.1111/joim.12991>. [Epub ahead of print].
- 4 Ten Berge B, Paats MS, Bergen IM *et al.* Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; **51**: 37–46.
- 5 Broos CE, van Nimwegen M, Hoogsteden HC, Hendriks RW, Kool M, van den Blink B. Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. *Front Immunol* 2013; **4**: 437.
- 6 Guenova E, Skabytska Y, Hoetzenecker W *et al.* IL-4 abrogates Th17 cell-mediated inflammation by selective silencing of IL-23 in antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**: 2163–2168.
- 7 Helming L, Gordon S. Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 33–42.
- 8 Locke LW, Crouser ED, White P *et al.* IL-13 regulated macrophage polarization during granuloma formation in an in vitro human sarcoidosis model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019; **60**: 84–95.
- 9 Lescoat A, Ballerie A, Augagneur Y *et al.* Distinct properties of human M-CSF and GM-CSF monocyte-derived macrophages to stimulate pathological lung conditions in vitro: application to systemic and inflammatory disorders with pulmonary involvement. *Int J Mol Sci* 2018; **19**: E894.
- 10 Huang Z, Luo Q, Guo Y *et al.* Mycobacterium tuberculosis-induced polarization of human macrophage orchestrates the formation and development of tuberculous granulomas in vitro. *PLoS ONE* 2015; **10**: e0129744.

DOI: 10.1111/jdv.16218

Chemical composition and distribution of tattoo inks within tattoo-associated keratoacanthoma

Editor

Carcinogenic risk of tattoo inks remains unclear, and their composition is poorly regulated. Various types of carcinogenic compounds can be found in tattoo inks, including primary aromatic amines (PAA), cleavage products of organic

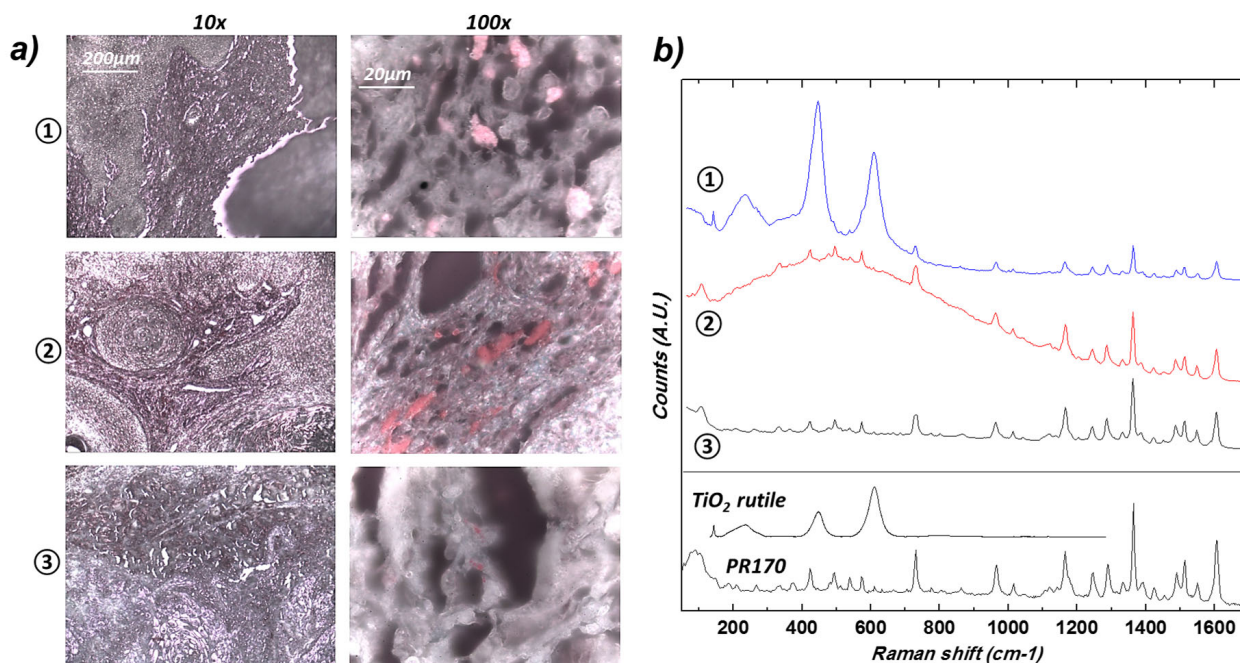


Fig. 1 (a) Optical micrographs of the three samples at two different magnifications (10× and 100×) revealing the presence of micron size red pigment clusters. On patient 1, note the heterogeneous and lighter aspect of the red pigment, suggesting the presence of nanoparticles of TiO₂. (b) Corresponding Raman spectra. Reference spectra are also given as comparison: PR170 dye sample (Kremer) and rutile (TiO₂) downloaded from the RRUFF database.

azo colourants, found in coloured inks.¹ Many cases of skin cancers occurring within tattoos have been reported, including cases of keratoacanthoma (KA) developed on red ink.² Pathogenesis of KA on tattoos remains unclear and is probably due to multiple factors: trauma induced by the needle

during the tattoo itself, inflammatory reactions, ultraviolet radiation, direct carcinogenicity of the tattoo inks and individual background.^{2,3}

Direct analysis of the composition of tattoo inks at the site of skin cancer could therefore be very interesting, but to our

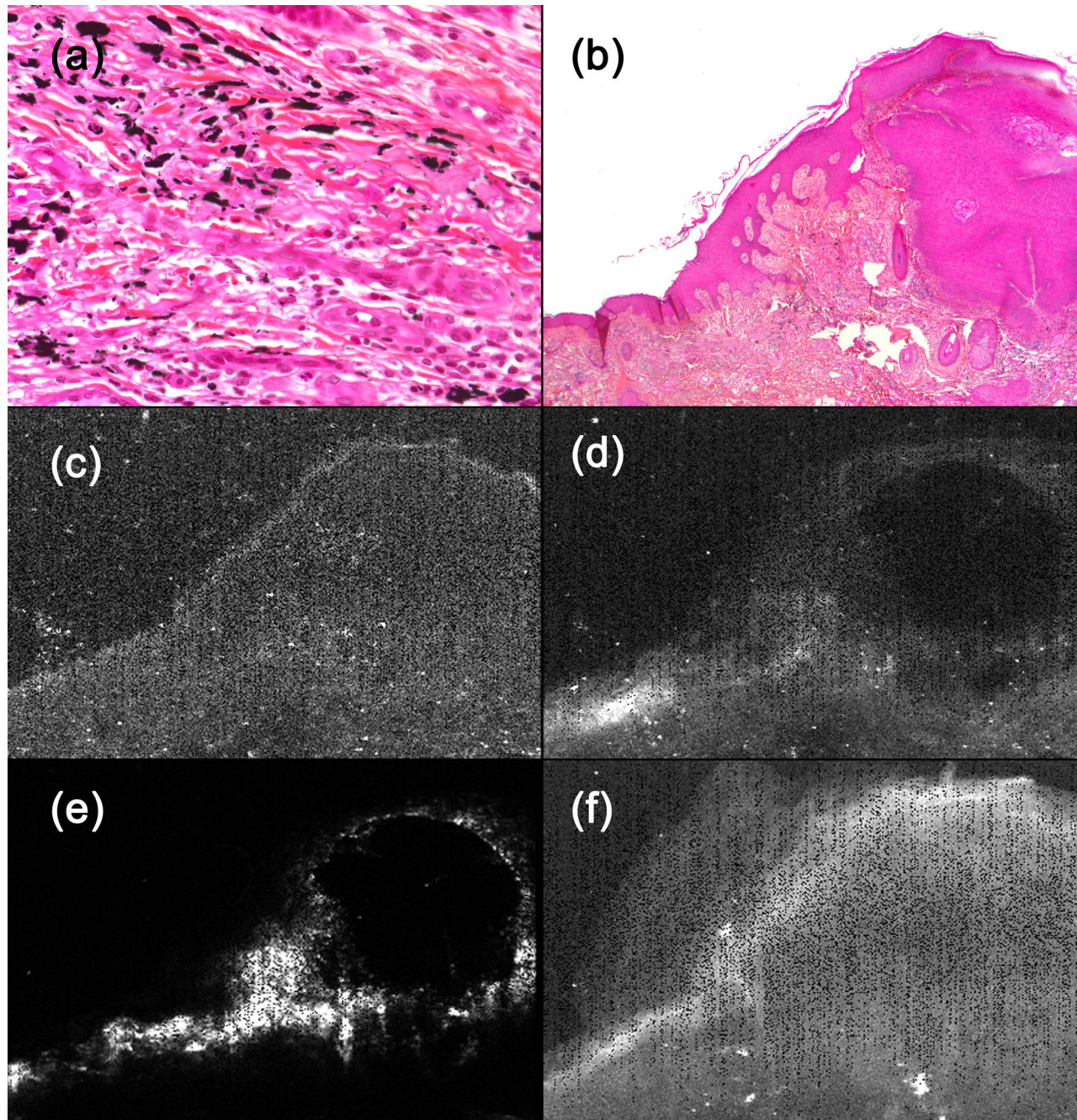


Fig. 2 Optical microscopy and XRF correlation: optical microscopy, showing mainly black ink in the superficial and deep dermis, with little, dispersed and less visible, pink ink: (a) haematoxylin-eosin-saffron (HES)-stained ($\times 400$) and (b) HES-stained ($\times 25$). XRF analysis: The main elements observed are (c) Ca, (d) Fe, (e) Ti and (f) Zn.

knowledge, this type of analysis has never been conducted before.

We report the precise organic and inorganic chemical composition and distribution of tattoo inks within three cases of tattoo-associated KA.

Clinical and histopathological data from three patients diagnosed with tattoo-associated KA in 2017 were collected in Bichat H. These data were completed by structural and chemical characterization of tattoo inks within KA, using Raman spectroscopy, to identify the organic compounds of tattoo inks, and synchrotron-based measurements – including X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) and X-ray absorption near-edge spectroscopy (XANES) – to identify the inorganic compounds.^{4,5}

All three patients developed KA on red ink within several weeks following the tattoo set-up procedure. For one patient, black and yellow inks were also used for the tattoo. A typical histopathological aspect of KA was observed in all three cases, associated with the presence of intra-dermal coloured pigments, located in the direct periphery of the tumoral mass.

Raman spectroscopy identified the same organic compound on all three samples. This Raman spectrum was compared to previous published data and to a reference dye sample (Kremer), allowing the identification of Pigment Red 170 (PR170).⁶ Raman spectroscopy also showed the presence of the rutile polymorph of titanium dioxide (TiO₂) particles for one patient who presented a KA on a lighter shade of red (Fig. 1).⁷

Synchrotron-based measurements identified iron and zinc oxide in all three samples and titanium oxide in one sample. A detailed analysis of XRF data showed that the spatial distribution of titanium was remarkably correlated to the position of the tumour (Fig. 2e). In order to describe the chemical phase of iron and zinc oxide and confirm the exogenous origin of these oxides, XANES analysis was performed, identifying zincite and goethite.⁸

We report the description of both the organic and inorganic chemical composition of tattoo inks in cases of KA. Our analyses demonstrated the presence of the same red azo pigment (PR170) in all three KA, consistently associated with metal oxide. Spatial correlation between both PR170, metal oxide and the tumour was found in all cases.

Genesis of PAA from azo pigments such as PR170 in humans is suspected to be the consequence of enzymatic activity, thermal decomposition or photodegradation, after UV light exposure.⁹ Metal oxides are efficient photocatalysts and could have potentiated photodegradation of PR170 in our cases.¹⁰

The presence of PR170 in these three KA raises the question of the carcinogenicity of this substance. Interestingly, PR170 is not listed by the European Council as a carcinogenic azo colourants. Analysis of more cases of skin cancer within tattoos using the same techniques would allow a better identification of potential carcinogenic compounds and help render tattoo ink composition safer.

H. Colboc,^{1,*} D. Bazin,² P. Moguelet,³ S. Reguer,⁴
R. Amode,⁵ C. Jouanneau,⁶ I. Lucas,⁷ L. Deschamps,⁸
V. Descamps,^{5,9} N. Kluger^{5,9}

¹Wound Healing Department, Rothschild Hospital, Sorbonne Université, Paris, France, ²CNRS, LCP, Ba340, Paris XI University, Orsay, France,

³Department of Pathology, Tenon Hospital, Sorbonne Université, Paris, France, ⁴DiffAbs beamline, Synchrotron SOLEIL L'Orme des Merisiers Saint-Aubin, Synchrotron Soleil, Gif-sur-Yvette Cedex, France, ⁵«Tattoo»

Consultation, Department of Dermatology, Bichat-Claude Bernard Hospital, HUPNVS, Paris, France, ⁶UMRS 1155, Tenon Hospital,

Sorbonne Université, Paris, France, ⁷UMR 8235, Sorbonne Université, Paris, France, ⁸Department of Pathology, Bichat-Claude Bernard Hospital,

HUPNVS, Paris, France, ⁹Department of Dermatology, Allergology and Venereology, Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland

*Correspondence: H. Colboc. E-mail: hester.colboc@aphp.fr

References

- 1 Laux P, Tralau T, Tentschert J *et al.* A medical-toxicological view of tattooing. *Lancet* 2016; **387**: 395–402.
- 2 Kluger N, Douvin D, Dupuis-Fourdan F, Doumecq-Lacoste JM, Descamps V. Keratoacanthomas on recent tattoos: two cases. *Ann Dermatol Venereol* 2017; **144**: 776–783.
- 3 Kluger N, Koljonen V. Tattoos, inks, and cancer. *Lancet Oncol* 2012; **13**: e161–e168.
- 4 Yakes BJ, Michael TJ, Perez-Gonzalez M, Harp BP. Investigation of tattoo pigments by Raman spectroscopy: investigation of tattoo pigments by Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 2017; **48**: 736–743.
- 5 Reguer S, Mocuta C, Thiaudière D, Daudon M, Bazin D. Combination of X-ray synchrotron radiation techniques to gather information for clinicians. *C R Chim* 2016; **19**: 1424–1431.
- 6 Scherrer NC, Stefan Z, Francoise D, Annette F, Renate K. Synthetic organic pigments of the 20th and 21st century relevant to artist's paints: Raman spectra reference collection. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2009; **73**: 505–524.
- 7 Frank O, Zukalova M, Laskova B, Kürti J, Koltai J, Kavan L. Raman spectra of titanium dioxide (anatase, rutile) with identified oxygen isotopes (16, 17, 18). *Phys Chem Chem Phys* 2012; **14**: 14567.
- 8 Dessombz A, Nguyen C, Ea H-K *et al.* Combining μ X-ray fluorescence, μ XANES and μ XRD to shed light on Zn²⁺ cations in cartilage and meniscus calcifications. *J Trace Elem Med Biol* 2013; **27**: 326–333.
- 9 Hauri U, Hohl C. Photostability and breakdown products of pigments currently used in tattoo inks. *Curr Probl Dermatol* 2015; **48**: 164–169.
- 10 Xue C, Wu J, Lan F *et al.* Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *J Nanosci Nanotechnol* 2010; **10**: 8500–8507.

DOI: 10.1111/jdv.16220

Cronkhite–Canada syndrome in an adult with titanium orthopaedic implants

Editor

Cronkhite–Canada syndrome (CCS) is a peculiar non-hereditary, gastrointestinal polyposis syndrome associated with characteristic ectodermal abnormalities, including skin

REFERENCES

1. Poloni LN, Ward MD. The materials science of pathological crystals. *Chem Mater*. 2014;26(1):477-95.
2. Bazin D, Daudon M, Combes C, Rey C. Characterization and some physicochemical aspects of pathological microcalcifications. *Chem Rev*. 2012;112(10):5092-120.
3. Bazin D, Daudon M. Physicochemistry in medicine: some selected examples. *J Spectr Imaging*. 2019;8:a16.
4. Molina-Ruiz AM, Cerroni L, Kutzner H, Requena L. Cutaneous deposits. *Am J Dermatopathol*. 2014;36(1):1-48.
5. Liu M-T, Cheng W-T, Li M-J, Liu H-N, Yang D-M, Lin S-Y. Identification of chemical compositions of skin calcified deposit by vibrational microspectroscopies. *Arch Dermatol Res*. 2005;297(5):231-4.
6. Walsh JS, Fairley JA. Calcifying disorders of the skin. *J Am Acad Dermatol*. 1995;33(5 Pt 1):693-706; quiz 707-10.
7. Niebel D, Poortinga S, Wenzel J. Osteoma Cutis and Calcinosis Cutis: « Similar but Different ». *J Clin Aesthetic Dermatol*. 2020;13(11):28-31.
8. Rafnsson V, Ingimarsson O, Hjalmarsson I, Gunnarsdottir H. Association between exposure to crystalline silica and risk of sarcoidosis. *Occup Environ Med*. 1998;55(10):657-60.
9. Wild CP. Complementing the Genome with an « Exposome »: The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(8):1847-50.
10. Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, et al. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 1999;12(5):247-56.
11. Keijsers RGM, van den Heuvel DAF, Grutters JC. Imaging the inflammatory activity of sarcoidosis. *Eur Respir J*. 2013;41(3):743-51.
12. Barna BP, Judson MA, Thomassen MJ. Inflammatory Pathways in Sarcoidosis. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1304:39-52.
13. Ma SA, Imadojemu S, Beer K, Seykora JT. Inflammatory features of frontal fibrosing alopecia. *J Cutan Pathol*. 2017;44(8):672-6.

14. Brunet-Possenti F, Deschamps L, Colboc H, Somogyi A, Medjoubi K, Bazin D, et al. Detection of titanium nanoparticles in the hair shafts of a patient with frontal fibrosing alopecia. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2018;32(12):e442-3.
15. Ruiz-Villaverde R, Fernandez-Crehuet P, Aguayo-Carreras P, Hernandez-Centeno JL, Cuenca-Barrales C. Inflammatory Reactions to Red Tattoo Inks: Three cases highlighting an emerging problem. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2018;18(2):e215-8.
16. Bose R, Sibley C, Fahim S. Granulomatous and systemic inflammatory reactions from tattoo ink: Case report and concise review. *SAGE Open Med Case Rep*. 2020;8:2050313X20936036.
17. Bonewald LF, Harris SE, Rosser J, Dallas MR, Dallas SL, Camacho NP, et al. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue Int*. 2003;72(5):537-47.
18. Lithiase urinaire DAUDON Michel, TRAXER Olivier, JUNGERS Paul. Librairie Lavoisier. 2012.
19. Frochot V, Castiglione V, Lucas IT, Haymann J-P, Letavernier E, Bazin D, et al. Advances in the identification of calcium carbonate urinary crystals. *Clin Chim Acta*. 2021;515:1-4.
20. Bilbault H, Perez J, Huguet L, Vandermeersch S, Placier S, Tabibzadeh N, et al. Urothelium proliferation is a trigger for renal crystal deposits in a murine lithogenesis model. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-9.
21. Dessombz A, Meria P, Bazin D, Daudon M. Prostatic stones: evidence of a specific chemistry related to infection and presence of bacterial imprints. *PLoS One*. 2012;7(12):e51691.
22. Guerlain J, Perie S, Lefevre M, Perez J, Vandermeersch S, Jouanneau C, et al. Localization and characterization of thyroid microcalcifications: A histopathological study. *PloS One*. 2019;14(10):e0224138.
23. Brisset F, microanalyse G national de ME à B et de. Microscopie électronique à balayage et microanalyses. EDP Sciences; 2012. 930 p.
24. Bazin D, Boudierlique E, Daudon M, Frochot V, Haymann J-P, Letavernier E, et al. Scanning electron microscopy—a powerful imaging technique for the clinician. *Comptes Rendus Chim*. 2021;25(S1):1.
25. Rouzière S, Bazin D, Daudon M. In-lab X-ray fluorescence and diffraction techniques for pathological calcifications. *Comptes Rendus Chim*. 2016;19(11):1404-15.
26. Bazin D, Foy E, Reguer S, Rouzière S, Fayard B, Colboc H, et al. The crucial contribution of X-ray fluorescence spectroscopy in medicine. *Comptes Rendus Chim*. 2022;25(S1):1-24.

27. Dao NQ, Daudon M. Infrared and Raman spectra of calculi. Elsevier; 1997.
28. Estepa L, Daudon M. Contribution of Fourier transform infrared spectroscopy to the identification of urinary stones and kidney crystal deposits. *Biospectroscopy*. 1997;3(5):347-69.
29. Daudon M, Bazin D. Vibrational spectroscopies to investigate concretions and ectopic calcifications for medical diagnosis. *Comptes Rendus Chim*. 2016;19(11-12):1416-23.
30. Lucas IT, Bazin D, Daudon M. Raman opportunities in the field of pathological calcifications. *Comptes Rendus Chim*. 2021;24(S2):1-21.
31. Tamosaityte S, Pucetaite M, Zelvyas A, Varvuolyte S, Hendrixson V, Sablinskas V. Raman spectroscopy as a non-destructive tool to determine the chemical composition of urinary sediments. *Comptes Rendus Chim*. 2021;24(S2):1-10.
32. Bazin D, Daudon M, Chevallier P, Rouziere S, Elkaim E, Thiaudiere D, et al. Les techniques de rayonnement synchrotron au service de la caractérisation d'objets biologiques: un exemple d'application, les calculs rénaux. In: *Annales de Biologie Clinique*. 2006. p. 125-39.
33. Bazin D, Haymann J-P, Emmanuel L, Rode J, Daudon M. Pathological calcifications: a medical diagnosis based on their physicochemical properties. *Presse Med*. févr 2014;43(2):135.
34. Bazin D, Reguer S, Vantelon D, Haymann J-P, Letavernier E, Frochot V, et al. XANES spectroscopy for the clinician. *Comptes Rendus Chim*. 2022;25(S1):1-20.
35. Rehr JJ, Ankudinov AL. Progress in the theory and interpretation of XANES. *Coord Chem Rev*. janv 2005;249(1-2):131-40.
36. Bazin D, Letavernier E, Haymann J-P, Frochot V, Daudon M. Crystalline pathologies in the human body: first steps of pathogenesis. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2020;78(4):349-362.
37. Daudon M, Jungers P, Bazin D. Peculiar Morphology of Stones in Primary Hyperoxaluria. *N Engl J Med*. 2008;359(1):100-2.
38. 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(11):e28007.
39. Reiter N, El-Shabrawi L, Leinweber B, Berghold A, Aberer E. Calcinosis cutis: part I. Diagnostic pathway. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(1):1-12; quiz 13-4.
40. Sprecher E. Familial tumoral calcinosis: from characterization of a rare phenotype to the pathogenesis of ectopic calcification. *J Invest Dermatol*. 2010;130(3):652-60.

41. Valenzuela A, Chung L. Management of Calcinosis Associated with Systemic Sclerosis. *Curr Treat Options Rheumatol*. 2016;2(1):85-96.
42. Quismorio FP, Dubois EL, Chandor SB. Soft-tissue calcification in systemic lupus erythematosus. *Arch Dermatol*. 1975;111(3):352-6.
43. Presley BC, Bush JS, Watson SC. Dermatomyositis with extensive calcification in an adult. *West J Emerg Med*. 2012;13(1):136-8.
44. Costrop L, Vanakker O, Van Laer L, Le Saux O, Martin L, Chassaing N, et al. Novel deletions causing pseudoxanthoma elasticum underscore the genomic instability of the ABCC6 region. *J Hum Genet*. 2010;55:112-7.
45. Gauhar R, Wilkinson J, Harris J, Manning J, Herrick A. Calcinosis preferentially affects the thumb compared to other fingers in patients with systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol*. 2016;45(4):317-20.
46. Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2008;74(2):148-57.
47. Nigwekar SU, Thadhani R, Brandenburg VM. Calciphylaxis. *N Engl J Med*. 2018;378(18):1704-14.
48. Lee SE, Lee SH. Skin Barrier and Calcium. *Ann Dermatol*. 2018;30(3):265.
49. Lansdown ABG. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair Regen*. 2002;10(5):271-85.
50. Adams MP, Mallet DG, Pettet GJ. Towards a quantitative theory of epidermal calcium profile formation in unwounded skin. *PloS One*. 2015;10(1):e0116751.
51. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop*. 2007;18(5):444-8.
52. Chung MP, Richardson C, Kirakossian D, Orandi AB, Saketkoo LA, Rider LG, et al. Calcinosis Biomarkers in Adult and Juvenile Dermatomyositis. *Autoimmun Rev*. 2020;19(6):102533.
53. Urganus AL, Zhao Y-D, Pachman LM. Juvenile dermatomyositis calcifications selectively displayed markers of bone formation. *Arthritis Rheum*. 2009;61(4):501-8.
54. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):282-90.
55. Mendoza FJ, Lopez I, Montes de Oca A, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Metabolic acidosis inhibits soft tissue calcification in uremic rats. *Kidney Int*. 2008;73(4):407-14.

56. Larsen MJ, Jensen SJ. The hydroxyapatite solubility product of human dental enamel as a function of pH in the range 4.6-7.6 at 20 degrees C. *Arch Oral Biol.* 1989;34(12):957-61.
57. Brandao-Burch A, Utting JC, Orriss IR, Arnett TR. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. *Calcif Tissue Int.* 2005;77(3):167-74.
58. Goding JW, Grobbs B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1638(1):1-19.
59. Orriss IR, Arnett TR, Russell RGG. Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;28:57-68.
60. Chassaing N, Martin L, Calvas P, Le Bert M, Hovnanian A. Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, pathophysiological and genetic update including 11 novel ABCC6 mutations. *J Med Genet.* 2005;42(12):881-92.
61. Hsu V, Schlesinger N, Li Q, Varga J. Reduced circulating levels of inorganic pyrophosphate are associated with ectopic calcification in scleroderma spectrum disorders. In: *ARTHRITIS & RHEUMATOLOGY*. WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA; 2019.
62. Van Summeren MJH, Spliet WGM, Van Royen-Kerkhof A, Vermeer C, Lilien M, Kuis W, et al. Calcinosis in juvenile dermatomyositis: a possible role for the vitamin K-dependent protein matrix Gla protein. *Rheumatology.* 2008;47(3):267-71.
63. Roy ME, Nishimoto SK. Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone.* 2002;31(2):296-302.
64. Wallin R, Cain D, Hutson SM, Sane DC, Loeser R. Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thromb Haemost.* 2000;84(6):1039-44.
65. Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev.* 2001;21(4):274-301.
66. Jiang Q, Uitto J. Restricting dietary magnesium accelerates ectopic connective tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum (Abcc6^{-/-}). *Exp Dermatol.* 2012;21(9):694-9.
67. Icer MA, Yıldıran H. Effects of fetuin-A with diverse functions and multiple mechanisms on human health. *Clin Biochem.* 2021;88:1-10.
68. Belloli L, Ughi N, Massarotti M, Marasini B, Biondi ML, Brambilla G. Role of fetuin-A in systemic sclerosis-associated calcinosis. *J Rheumatol.* 2010;37(12):2638-9.

69. Marhaug G, Shah V, Shroff R, Varsani H, Wedderburn LR, Pilkington CA, et al. Age-dependent inhibition of ectopic calcification: a possible role for fetuin-A and osteopontin in patients with juvenile dermatomyositis with calcinosis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2008;47(7):1031-7.
70. Richardson C, Plaas A, Varga J. Calcinosis in Systemic Sclerosis: Updates in Pathophysiology, Evaluation, and Treatment. *Curr Rheumatol Rep*. 2020;22(10):73.
71. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol*. 2002;161(6):2035-46.
72. Gourgas O, Muiznieks LD, Bello DG, Nanci A, Sharpe S, Cerruti M. Cross-Linked Elastin-like Polypeptide Membranes as a Model for Medial Arterial Calcification. *Biomacromolecules*. 2019;20(7):2625-36.
73. Stock SR. The mineral–collagen interface in bone. *Calcif Tissue Int*. 2015;97(3):262-80.
74. Paul RG, Bailey AJ. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996;28(12):1297-310.
75. Fang W, Zhang H, Yin J, Yang B, Zhang Y, Li J, et al. Hydroxyapatite crystal formation in the presence of polysaccharide. *Cryst Growth Des*. 2016;16(3):1247-55.
76. Inagaki Y, Kashima TG, Hookway ES, Tanaka Y, Hassan AB, Oppermann U, et al. Dentine matrix protein 1 (DMP-1) is a marker of bone formation and mineralisation in soft tissue tumours. *Virchows Arch*. 2015;466(4):445-52.
77. Bahrani E, Perkins IU, North JP. Diagnosing Calciphylaxis: A Review With Emphasis on Histopathology. *Am J Dermatopathol*. 2020;42(7):471-80.
78. 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(2):296-301.
79. Spicer SS, Brissie RM, Thompson NT. Variability of dermal elastin visualized ultrastructurally with iron hematoxylin. *Am J Pathol*. 1975;79(3):481-98.
80. Munavalli G, Reisenauer A, Moses M, Kilroy S, Arbiser JL. Weight loss-induced calciphylaxis: potential role of matrix metalloproteinases. *J Dermatol*. 2003;30(12):915-9.
81. Satta J, Oiva J, Salo T, Eriksen H, Ohtonen P, Biancari F, et al. Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis. *Ann Thorac Surg*. 2003;76(3):681-8.
82. Qin X, Corriere MA, Matrisian LM, Guzman RJ. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(7):1510-6.

83. Lotz M, Rosen F, McCabe G, Quach J, Blanco F, Dudler J, et al. Interleukin 1 beta suppresses transforming growth factor-induced inorganic pyrophosphate (PPi) production and expression of the PPi-generating enzyme PC-1 in human chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(22):10364-8.
84. Ferreira E, Porter RM, Wehling N, O'Sullivan RP, Liu F, Boskey A, et al. Inflammatory cytokines induce a unique mineralizing phenotype in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow. *J Biol Chem*. 2013;288(41):29494-505.
85. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2004;110(22):3480-7.
86. Hénaut L, Mentaverri R, Liabeuf S, Bargnoux A-S, Delanaye P, Cavalier É, et al. Pathophysiological mechanisms of vascular calcification. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2015;73(3):271-87.
87. Traineau H, Aggarwal R, Monfort J-B, Senet P, Oddis CV, Chizzolini C, et al. Treatment of calcinosis cutis in systemic sclerosis and dermatomyositis: A review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 2020;82(2):317-25.
88. Marco Puche A, Calvo Penades I, Lopez Montesinos B. Effectiveness of the treatment with intravenous pamidronate in calcinosis in juvenile dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28(1):135-40.
89. Tayfur AC, Topaloglu R, Gulhan B, Bilginer Y. Bisphosphonates in juvenile dermatomyositis with dystrophic calcinosis. *Mod Rheumatol*. 2015;25(4):615-20.
90. Saini I, Kalaivani M, Kabra SK. Calcinosis in juvenile dermatomyositis: frequency, risk factors and outcome. *Rheumatol Int*. 2016;36(7):961-5.
91. Balin SJ, Wetter DA, Andersen LK, Davis MDP. Calcinosis cutis occurring in association with autoimmune connective tissue disease: the Mayo Clinic experience with 78 patients, 1996-2009. *Arch Dermatol*. 2012;148(4):455-62.
92. Pasch A, Schaffner T, Huynh-Do U, Frey BM, Frey FJ, Farese S. Sodium thiosulfate prevents vascular calcifications in uremic rats. *Kidney Int*. 2008;74(11):1444-53.
93. Nasi S, Ea H-K, Lioté F, So A, Busso N. Sodium Thiosulfate Prevents Chondrocyte Mineralization and Reduces the Severity of Murine Osteoarthritis. *PloS One*. 2016;11(7):e0158196.
94. Nigwekar SU, Brunelli SM, Meade D, Wang W, Hymes J, Lacson E. Sodium thiosulfate therapy for calcific uremic arteriolopathy. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2013;8(7):1162-70.

95. O'Neill WC, Hardcastle KI. The chemistry of thiosulfate and vascular calcification. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2012;27(2):521-6.
96. Mageau A, Guigonis V, Ratzimbasafy V, Bardin T, Richette P, Urena P, et al. Intravenous sodium thiosulfate for treating tumoral calcinosis associated with systemic disorders: Report of four cases. *Joint Bone Spine.* 2017;84(3):341-4.
97. Trysberg E, Werna S, Sakiniene E. AB0617 effect of sodium thiosulfate on calcinosis cutis associated with connective tissue disease. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(Suppl 2):1009-10.
98. Fredi M, Bartoli F, Cavazzana I, Carabellese N, Ceribelli A, Tincani A, et al. SAT0469 calcinosis cutis in poly-dermatomyositis: clinical and therapeutic study. *BMJ Publishing Group Ltd;* 2015.
99. Baumgartner-Nielsen J, Olesen AB. Treatment of Skin Calcifications with Intra-lesional Injection of Sodium Thiosulphate: A Case Series. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(2):257-8.
100. Donahue HJ, Iijima K, Goligorsky MS, Rubin CT, Rifkin BR. Regulation of cytoplasmic calcium concentration in tetracycline-treated osteoclasts. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 1992;7(11):1313-8.
101. Cohen H, Solomon V, Alferiev IS, Breuer E, Ornoy A, Patlas N, et al. Bisphosphonates and tetracycline: experimental models for their evaluation in calcium-related disorders. *Pharm Res.* 1998;15(4):606-13.
102. Robertson LP, Marshall RW, Hickling P. Treatment of cutaneous calcinosis in limited systemic sclerosis with minocycline. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(3):267-9.
103. Melone CP, McLoughlin JC, Beldner S. Surgical management of the hand in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 1999;11(6):514-20.
104. Fahmy FS, Evans DM, Devaraj VS. Microdrilling of digital calcinosis. *Eur J Plast Surg.* 1998;21(7):378-80.
105. Bottomley WW, Goodfield MJ, Sheehan-Dare RA. Digital calcification in systemic sclerosis: effective treatment with good tissue preservation using the carbon dioxide laser. *Br J Dermatol.* 1996;135(2):302-4.
106. Sultan-Bichat N, Menard J, Perceau G, Staerman F, Bernard P, Reguiã Z. Treatment of calcinosis cutis by extracorporeal shock-wave lithotripsy. *J Am Acad Dermatol.* mars 2012;66(3):424-9.
107. Takayama H, Pak K, Tomoyoshi T. Electron Microscopic Study of Mineral Deposits in Idiopathic Calcinosis of the Scrotum. *J Urol.* 1982;127(5):915-8.

108. Hashimoto K, DiBella RJ. Electron microscopic studies of normal and abnormal elastic fibers of the skin. *J Invest Dermatol.* 1967;48(5):405-23.
109. Pasquali Ronchetti I, Baccarani Contri M, Pincelli C, Bertazzoni GM. Effect of selective enzymatic digestions on skin biopsies from pseudoxanthoma elasticum: an ultrastructural study. *Arch Dermatol Res.* 1986;278(5):386-92.
110. Kociak M. Introduction à la microscopie électronique. Collection de la Société Française de la Neutronique. EDP Sciences; 2007. p. 61-74.
111. Chapman DM, Boskey AL, Tesch M, Janigan DT. Subcutaneous microvascular (capillary) calcification. Another basis for livedo-like skin changes. *Clin Exp Dermatol.* 1995;20(3):213-7.
112. Almeida HL de, Almeida MG de, Jorge VM, Abreu LB de. Ultrastructural aspects of pseudoxanthoma elasticum. *An Bras Dermatol.* 2017;92(4):527-30.
113. Lin S-Y. Biochemical and molecular aspects of spectral diagnosis in calcinosis cutis. *Expert Rev Mol Med.* 2014;16:e6.
114. Cazalbou S, Combes C, Eichert D, Rey C. Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates. *J Mater Chem.* 2004;14(14):2148-53.
115. Combes C, Cazalbou S, Rey C. Apatite Biominerals. *Minerals.* 2016;6(2):34.
116. Resende NS, Nele M, Salim VMM. Effects of anion substitution on the acid properties of hydroxyapatite. *Thermochim Acta.* 2006;451(1):16-21.
117. Carpentier X, Daudon M, Traxer O, Jungers P, Mazouyes A, Matzen G, et al. Relationships Between Carbonation Rate of Carbapatite and Morphologic Characteristics of Calcium Phosphate Stones and Etiology. *Urology.* 2009;73(5):968-75.
118. Gaft M, Reisfeld R, Panczer G. Modern Luminescence Spectroscopy of Minerals and Materials. Springer; 2015. 620 p.
119. Daculsi G, Legeros RZ, Legeros JP, Mitre D. Lattice defects in calcium phosphate ceramics: High resolution TEM ultrastructural study. *J Appl Biomater.* 1991;2(3):147-52.
120. Fleet ME, Liu X. Coupled substitution of type A and B carbonate in sodium-bearing apatite. *Biomaterials.* 2007;28(6):916-26.
121. Daudon M, Bazin D. Vibrational spectroscopies to investigate concretions and ectopic calcifications for medical diagnosis. *Comptes Rendus Chim.* 2016;19(11-12):1416-23.
122. Bazin D, Chevallier P, Matzen G, Jungers P, Daudon M. Heavy elements in urinary stones. *Urol Res.* 2007;35(4):179-84.

123. Carpentier X, Bazin D, Combes C, Mazouyes A, Rouzière S, Albouy PA, et al. High Zn content of Randall's plaque: a μ -X-ray fluorescence investigation. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS*. 2011;25(3):160-5.
124. Eidelman N, Boyde A, Bushby AJ, Howell PG, Sun J, Newbury DE, et al. Microstructure and mineral composition of dystrophic calcification associated with the idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):1-21.
125. Franzen M, Moré E, Cadamuro J, Koller J, Salmhofer W, Wohlmuth-Wieser I, et al. Mineral depositions of calcifying skin disorders are predominantly composed of carbonate apatite. *Acta Derm Venereol*. 2017;97:1178-81.
126. Kramann R, Brandenburg VM, Schurgers LJ, Ketteler M, Westphal S, Leisten I, et al. Novel insights into osteogenesis and matrix remodelling associated with calcific uraemic arteriolopathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(4):856-68.
127. Reid JD, Andersen ME. Calcium oxalate in sarcoid granulomas. With particular reference to the small ovoid body and a note on the finding of dolomite. *Am J Clin Pathol*. nov 1988;90(5):545-58.
128. Kim YC, Triffet MK, Gibson LE. Foreign bodies in sarcoidosis. *Am J Dermatopathol*. 2000;22(5):408-12.
129. Terzakis J, Eisenmenger W, Reidy J. X-ray microanalysis of crystalline material in the liver of a narcotics user. *Am J Clin Pathol*. 1984.
130. Demetriou ET, Pietras SM, Holick MF. Hypercalcemia and soft tissue calcification owing to sarcoidosis: The sunlight-cola connection. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1695-9.
131. Lakhdar AB, Daudon M, Mathieu M, Kellum A, Balleyguier C, Bazin D. Underlining the complexity of the structural and chemical characteristics of ectopic calcifications in breast tissues through FE-SEM and μ FTIR spectroscopy. 2016.
132. Ogino T, Suzuki T, Sawada K. The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water. *Geochim Cosmochim Acta*. 1987;51(10):2757-67.
133. Broos CE, van Nimwegen M, Hoogsteden HC, Hendriks RW, Kool M, van den Blink B. Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. *Front Immunol*. 2013;4:437.
134. Berlin JL, Shantha GPS, Yeager H, Thomas-Hemak L. Serum vitamin D levels may not reflect tissue-level vitamin D in sarcoidosis. *Case Rep*. 2014;2014:bcr2014203759.
135. Hayden MR, Goldsmith DJ. Sodium thiosulfate: new hope for the treatment of calciphylaxis. In: *Seminars in dialysis*. Wiley Online Library; 2010. p. 258-62.
136. Boulter EL, Beard L, Ryder C, Pilkington CA. Effectiveness of anti-TNF- α agents in the treatment of refractory juvenile dermatomyositis. *Pediatr Rheumatol*. 2011;9(1):1-1.

137. Galimberti F, Li Y, Fernandez AP. Intravenous immunoglobulin for treatment of dermatomyositis-associated dystrophic calcinosis. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(1):174-6.
138. Strupler M, Pena A-M, Hernest M, Tharaux P-L, Martin J-L, Beaurepaire E, et al. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Opt Express*. 2007;15(7):4054-65.
139. Bancelin S, Aimé C, Gusachenko I, Kowalczyk L, Latour G, Coradin T, et al. Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals. *Nat Commun*. 2014;5(1):1-8.
140. Pena A-M, Fagot D, Olive C, Michelet J-F, Galey J-B, Leroy F, et al. Multiphoton microscopy of engineered dermal substitutes: assessment of 3-D collagen matrix remodeling induced by fibroblast contraction. *J Biomed Opt*. 2010;15(5):056018.
141. Lynch B, Bonod-Bidaud C, Ducourthial G, Affagard J-S, Bancelin S, Psilodimitrakopoulos S, et al. How aging impacts skin biomechanics: a multiscale study in mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-10.
142. Boulesteix T, Pena A-M, Pagès N, Godeau G, Sauviat M-P, Beaurepaire E, et al. Micrometer scale ex vivo multiphoton imaging of unstained arterial wall structure. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2006;69(1):20-6.
143. Schanne-Klein M-C. L'imagerie multiphoton des peaux naturelles et synthétiques. Un nouvel outil pour l'évaluation des produits cosmétiques. *Photoniques*. 2017;(88):21-4.
144. Berg S, Kutra D, Kroeger T, Straehle CN, Kausler BX, Haubold C, et al. Ilastik: interactive machine learning for (bio) image analysis. *Nat Methods*. 2019;16(12):1226-32.
145. Wang H, Shyr T, Fevola MJ, Cula GO, Stamatas GN. Age-related morphological changes of the dermal matrix in human skin documented in vivo by multiphoton microscopy. *J Biomed Opt*. 2018;23(3):030501.
146. Cui JZ, Tehrani AY, Jett KA, Bernatchez P, van Breemen C, Esfandiarei M. Quantification of aortic and cutaneous elastin and collagen morphology in Marfan syndrome by multiphoton microscopy. *J Struct Biol*. 2014;187(3):242-53.
147. Tong PL, Qin J, Cooper CL, Lowe PM, Murrell DF, Kossard S, et al. A quantitative approach to histopathological dissection of elastin-related disorders using multiphoton microscopy. *Br J Dermatol*. 2013;169(4):869-79.
148. Penn LA, Brinster N. Calciophylaxis with pseudoxanthoma elasticum-like changes: A case series. *J Cutan Pathol*. 2018;45(2):118-21.
149. Caspers PJ, Lucassen GW, Wolthuis R, Bruining HA, Puppels GJ. In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. *Biospectroscopy*. 1998;4(S5):S31-9.

150. Michel AP, Liakat S, Bors K, Gmachl CF. In vivo measurement of mid-infrared light scattering from human skin. *Biomed Opt Express*. 2013;4(4):520-30.
151. Bradley DA, Farquharson MJ. X-ray fluorescence and the in vivo evaluation of Fe, Cu and Zn in skin. *J Radioanal Nucl Chem*. 2000;244(1):213-7.
152. Fercher AF. Optical coherence tomography. *J Biomed Opt*. 1996;1(2):157-73.
153. Schuman JS, Fujimoto JJ, Duker JS, Ishikawa H, Wollstein G. Optical coherence tomography of ocular diseases. SLACK incorporated; 2021.
154. Bezerra HG, Costa MA, Guagliumi G, Rollins AM, Simon DI. Intracoronary optical coherence tomography: a comprehensive review: clinical and research applications. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2(11):1035-46.
155. Adler DC, Chen Y, Huber R, Schmitt J, Connolly J, Fujimoto JG. Three-dimensional endomicroscopy using optical coherence tomography. *Nat Photonics*. 2007;1(12):709-16.
156. Levine A, Wang K, Markowitz O. Optical coherence tomography in the diagnosis of skin cancer. *Dermatol Clin*. 2017;35(4):465-88.
157. Cazalas M, Levecq O, Azimani H, Siret D, Barut A, Suppa M, et al. Skin lesion imaging with line-field confocal optical coherence tomography. In: *Photonics in Dermatology and Plastic Surgery 2019*. SPIE; 2019. p. 61-8.

RESUME :

Bien que de nombreuses pathologies dermatologiques soient associées à des dépôts cutanés pathologiques, endogènes ou exogènes, ceux-ci restent mal décrits. Leur taille sub-micrométrique ainsi que leur diversité de composition chimique nécessitent l'utilisation de divers outils physico-chimiques pour en permettre une caractérisation complète. Notre objectif est d'apporter une caractérisation physico-chimique multi échelle du micromètre au nanomètre, mais aussi d'explorer la genèse et les conséquences tissulaires de ces dépôts en utilisant différentes techniques afin d'en extraire un message clinique. Après avoir présenté les connaissances actuelles sur ces dermatoses calcifiantes et décrit les principes de la microscopie électronique à balayage couplée à la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie et des spectroscopies vibrationnelles, nous présentons l'application de ces outils à quatre dermatoses différentes : calciphylaxie, ulcères de jambe calcifiés, calcinosis cutis sur nécrolyse épidermique et sarcoïdose. L'ensemble de nos résultats montrent que les dépôts cutanés endogènes sont principalement composés de carbapatite, dont l'aspect ultra-structural correspond à des nano-sphérules phospho-calciques s'agréant pour former des plaques de dimension micronique. Ces dépôts présentent un tropisme vis-à-vis des fibres élastiques que des études complémentaires par microscopie multiphoton permettront d'explorer. Ces résultats originaux permettent de mieux comprendre la physio genèse des calcifications cutanées, mais également d'envisager des méthodes de diagnostic ainsi que des pistes thérapeutiques.

MOTS CLES :

Dermato-pathologie, Spectroscopies vibrationnelles, Microscopie électronique à balayage, Calcifications cutanées.