

LA TECHNIQUE DE MARQUAGE VITAL DES TISSUS SQUELETTIQUES DES POISSONS

François MEUNIER *

En décrivant la technique du « marquage vital » des tissus squelettiques chez les Poissons, nous voudrions présenter un « outil de travail » encore peu utilisé par les Ichthyologistes et en expliquer l'intérêt pour diverses études. Cette technique, qui a fait progresser rapidement les connaissances sur la physiologie osseuse des Mammifères, doit devenir un instrument de choix dans les études relatives à la biologie des tissus squelettiques des Poissons.

Après les observations de BELCHIER en 1737 (1) sur le porc et le coq, c'est DUHAMEL, en 1739 et 1741 (5-6), qui, avec son travail sur les os longs du porc et de divers oiseaux, a utilisé le premier la technique du marquage du tissu osseux *in vivo*. DUHAMEL incorpore de la garance à la nourriture de ses animaux (pigeon, dindon, poule et porc) ; le principe actif et coloré de cette plante, l'alizarine, se retrouve dans le tissu osseux, ce qui lui a permis, par un examen macroscopique, de démontrer que la croissance en épaisseur des os longs se fait par apposition.

En fait la mise au point véritable de la technique du marquage vital n'a fait de véritables progrès, sur les Mammifères, que depuis une vingtaine d'années, avec la découverte des propriétés de la tétracycline vis-à-vis des tissus squelettiques (4, 8, 14, 18, 19). Cet antibiotique, administré à un vertébré, se fixe sur le tissu osseux en cours de minéralisation, qui acquiert une vive fluorescence lorsqu'il est observé en lumière ultra-violette. Cette fixation est définitive et seule la résorption du tissu osseux peut faire disparaître le marquage à la tétracycline. Dans la mesure où cet antibiotique ne présente pas de toxicité générale et n'inhibe pas l'ostéogenèse (ce qui semble être le cas dans la limite des doses utilisées), la méthode permet de distinguer les tissus osseux formés avant, pendant et après l'administration de la substance et ainsi de dater le déroulement de l'ossification.

* Equipe de Recherche « Formations squelettiques » - Laboratoire d'Anatomie comparée - Université Paris 7 - 2, Place Jussieu - Paris 75005.

D'autres substances fluorescentes se comportent comme la tétracycline ; nous pouvons citer la fluorescéine (20, 25), l'alizarine (4, 27) et l'orangé de xylénol (22) parmi les plus utilisées*. Il faut noter que certains cations comme le Ca 45 (21) ou le plomb (21, 28) ont été utilisés comme marqueurs du tissu osseux en cours de formation.

On a pu utiliser la technique du marquage à la tétracycline sur des représentants des autres classes de vertébrés : Reptiles (3, 11), Amphibiens (24) et surtout Ostéichthiens (2, 10, 12, 13, 15, 23, 30). Les travaux utilisant la tétracycline chez les poissons ont été précédés par la mise au point d'une méthode d'étude avec des sels de plomb (7, 9). Ce métal se fixe aussi bien sur les vertèbres, les opercules et les lépidotriches que sur les écailles. Toutefois il peut s'avérer toxique pour la survie des poissons (26), et on lui préfère d'autres marqueurs.

L'administration des divers marqueurs peut se faire, chez les Poissons, de différentes façons (15, 17, 29, 30) :

- injection intrapéritonéale ou intramusculaire,
- immersion des animaux dans une solution,
- incorporation dans la nourriture.

Nous avons opté pour l'injection intrapéritonéale qui permet de bien contrôler la dose administrée. Toutefois, il peut être intéressant, pour marquer un grand nombre d'alevins, de pratiquer le nourrissage selon le procédé de WEBER et RIDGWAY (29, 30). Ainsi la technique d'administration du marqueur est essentiellement fonction du travail envisagé et en rapport avec la taille et le nombre des poissons utilisés.

Sur des Téléostéens marqués à la tétracycline, les marques fluorescentes se retrouvent rapidement sur tous les tissus squelettiques (os ou cartilage calcifié) et nous les avons observées notamment sur la mandibule, les vertèbres, les lépidotriches, les écailles, les otolithes. Sur ces deux derniers organes, qui ne sont soumis à aucune résorption, le marquage est définitif.

Un perfectionnement de la méthode consiste à procéder à plusieurs marquages successifs en utilisant la même substance ou des substances fluorescentes différentes (tétracycline, fluorescéine, alizarine, orangé de xylénol). On pourra ainsi déterminer la quantité d'os déposée en un temps donné et suivre d'éventuelles variations de la vitesse du dépôt (13, 15, 16, 23). La méthode permet aussi de mieux analyser les remaniements des tissus osseux. Un exemple précis illustre ce type d'observation.

Les Fig. 1 et 2 représentent des coupes transversales dans la mandibule d'un brochet (39 g, 18,1 cm) ; la Fig. 3 est une portion d'écaille du même animal. Ce brochet a reçu trois injections successives de marqueurs différents**. Le

* La tétracycline, la fluorescéine, l'alizarine et l'orangé de xylénol absorbent les rayons ultra-violet et émettent un rayonnement fluorescent dont la longueur d'onde se situe respectivement dans le jaune, dans le jaune-vert et, pour les deux dernières substances, dans le rouge. Cette propriété est utilisée pour localiser les marqueurs sur les tissus (17).

** Le chlorhydrate de tétracycline à 1 % dans une solution de NaCl à 6 ‰ est injecté à raison de 50 mg/kg ; la fluorescéine à 2 % dans du bicarbonate de soude à 2 % est injectée à raison de 30 à 40 mg/kg ; l'orangé de xylénol à 3 % dans une solution aqueuse est administré à la dose de 90 mg/kg ; enfin l'alizarine, à 1,6 % dans du NaCl à 6 ‰, est injectée à raison de 80 mg/kg.

premier marquage à la tétracycline a précédé de 45 jours une injection de fluorescéine, suivie à son tour d'une injection d'orangé de xylénol après un nouveau délai de 49 jours. L'animal a été sacrifié 4 jours après cette dernière. Au niveau du dentaire, cette méthode permet de donner avec exactitude le moment de la formation de la dent. La Fig. 1 montre une dent en fin de développement, dont l'ostéodentine ainsi que l'os d'attache donnent une vive fluorescence rouge (due au xylénol) tandis que sur le dentaire (partie droite du cliché) apparaissent deux zones de marquage, à la tétracycline (jaune d'or) et à la fluorescéine (jaune vert). La couronne de la dent et le tissu de fixation sont en cours de minéralisation lors de la 3^e injection. La dent de la Fig. 2 n'a subi aucun marquage. Son socle d'os d'attache repose sur la couche marquée à la fluorescéine (jaune vert) et légèrement érodée. On peut donc conclure que la dent et son socle se sont édifiés après l'injection de fluorescéine et avant la dernière injection (xylénol). Les deux coupes ont été faites dans la même mandibule, on peut en déduire que les deux dents n'ont pas tout à fait le même âge. En outre, on peut affirmer à partir de la Fig. 2 que le développement complet de la dent s'est fait en moins de 49 jours. Cet exemple montre bien les données que l'on peut obtenir à partir de cette technique.

L'évaluation de l'âge par la scalimétrie est souvent délicate. On comprend que le marquage répété par des injections de tétracycline (seule ou combinée à d'autres marqueurs, Fig. 3) administrée à des périodes connues, facilite la lecture des écailles et permet de suivre clairement leur évolution. L'utilisation des écailles a l'avantage (sur d'autres tissus minéralisés) que leur faible épaisseur autorise une observation directe et évite ainsi les opérations longues et délicates exigées par la réalisation des lames minces.

Dans la mesure où les marqueurs sont utilisés pour des études de scalimétrie, il faut noter que la fluorescéine, l'alizarine et l'orangé de xylénol sont visibles en lumière normale transmise ou réfléchiée ; ils apparaissent alors respectivement en jaune-orangé, rouge et rouge-orangé*.

Nous n'avons pas enregistré, dans l'état actuel de nos recherches (17), d'effets néfastes sur la croissance pour les doses optimales de marquage. Ceci confirme les observations d'autres auteurs. Au niveau du tissu osseux lui-même il ne semble pas y avoir non plus d'effets secondaires. Seule une étude quantitative de la minéralisation pourra peut-être révéler des différences.

CONCLUSION

Les quelques travaux sur l'ostéogénèse des Poissons, utilisant en partie cette technique du marquage vital, ont déjà permis quelques progrès de nos connaissances dans ce domaine. Toutefois, le nombre des chercheurs qui utilisent la technique du marquage vital pour des études sur les Poissons reste encore limité. On peut penser que dans les années à venir elle se développera de façon sensible dans deux directions, d'une part, pour des travaux de scalimétrie, d'autre part, pour des études sur l'ostéogénèse et le remaniement du tissu osseux chez les Ostéichthyens, en association avec d'autres techniques mises au point pour ce genre de recherches.

Rappelons que les marqueurs fluorescents présentent bien des avantages par rapport au Ca 45 : facilité d'obtention de la drogue, longue vie dans le tissu osseux, sécurité dans la manipulation et coût économique, facilité d'administration, absence d'effets secondaires quand les doses sont à l'état de traces.

* Un équipement de microscopie de fluorescence est alors en partie superflu.

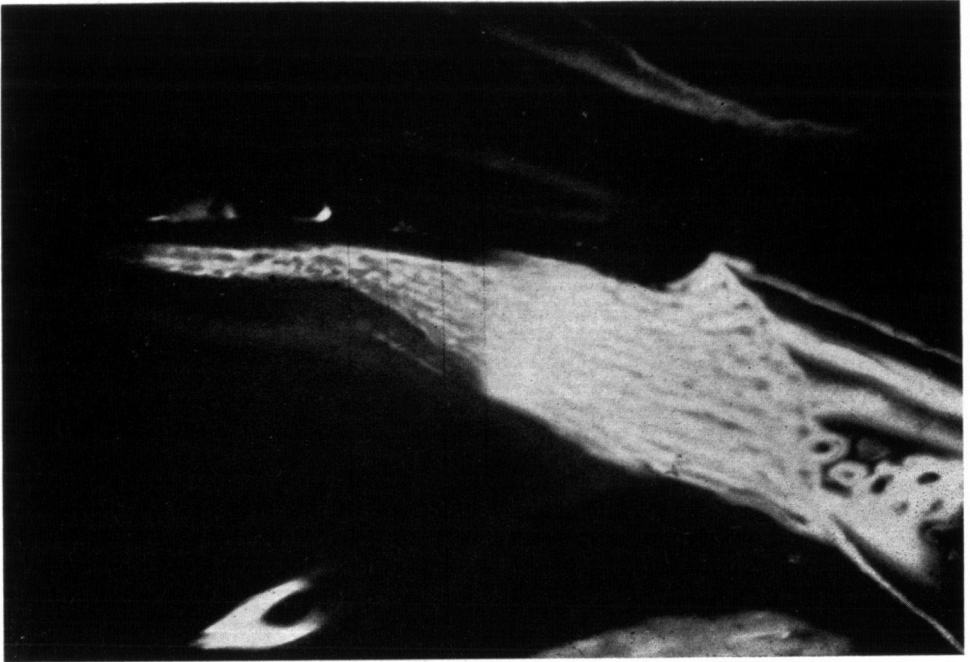


Fig. 1

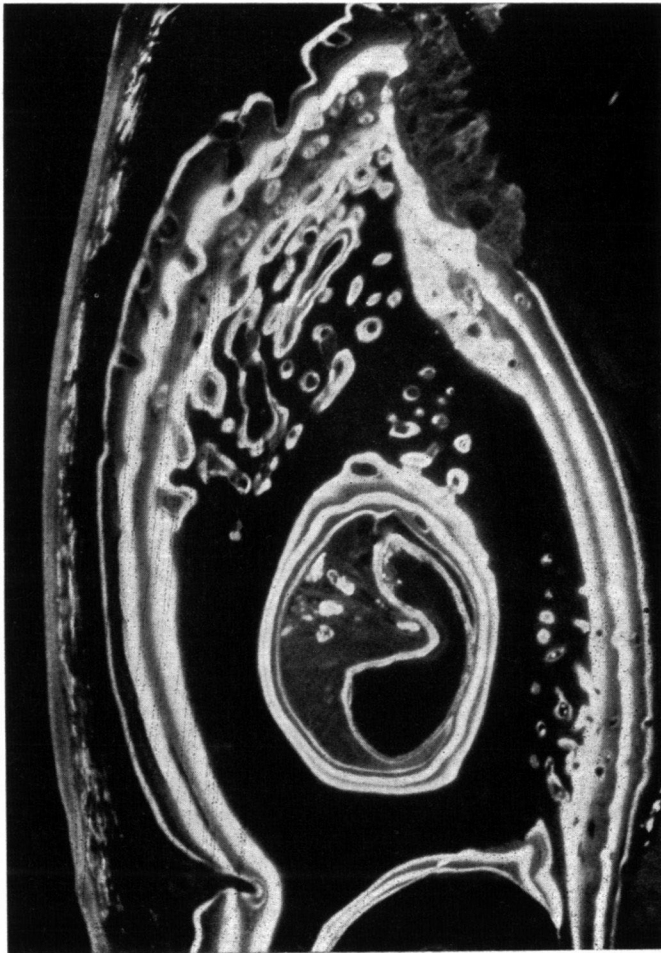


Fig. 2

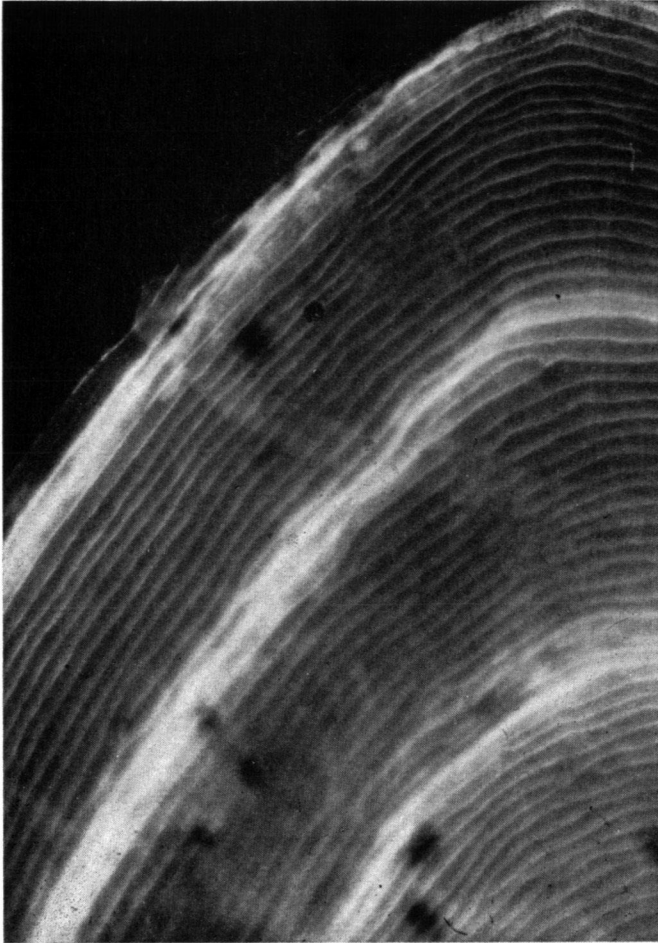


Fig. 3

PLANCHE

- Fig. 1 — Coupe transversale ($100\ \mu$) dans une mandibule (la dent est coupée tangentiellement). L'extrémité dorsale du dentaire a été érodée après l'injection de la fluorescéine et avant la mise en place de la dent. Celle-ci s'est vivement colorée par l'orangé de xylénol au niveau de l'ostéodentine (au centre).
- Fig. 2 — Coupe transversale ($55\ \mu$) de la même mandibule mais à un niveau plus antérieur. Ici la résorption, précédant la mise en place de la dent (en haut, à droite) n'a pratiquement pas attaqué la région marquée par la fluorescéine. Noter sur cette préparation une zone de remaniement actif dans la région du canal sensoriel (en bas) et l'abondance des ostéones primaires (en bas, à droite et en haut, à gauche).
- Fig. 3 — Région antérieure d'une écaille. Noter les dépôts concentriques successifs des trois marqueurs : tétracycline (jaune d'or), fluorescéine (jaune-vert) et l'orangé de xylénol (rouge-orangé) à la périphérie (en haut, à droite).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BELCHIER, 1737, in DUHAMEL 1739.
- (2) BONT (de) A.F., Van COILLIE R., 1966. Scalimétrie à l'aide de tétracyclines. *Verh. Intern. Verein. Limn.*, 16, 1130-1134.
- (3) CASTANET J., NAULLEAU G., 1975. Données expérimentales sur la valeur des marques squelettiques comme indicateur de l'âge chez *Vipera aspis* (L.). *Zool. Scripta* (sous presse).
- (4) DHEM A., 1967. *Le remaniement de l'os adulte*. Editions Arscia, Bruxelles, 1-118.
- (5) DUHAMEL H.L., 1739. Sur une racine qui a la faculté de teindre en rouge les os des animaux. *Mém. Acad. Roy. Sci.*, 1-13.
- (6) DUHAMEL H.L., 1742. Sur le développement et la crue des os des animaux. *Mém. Acad. Roy. Sci.*, 354-370.
- (7) HIYAMA Y., ICHIKAWA R., 1952. A method to mark the time in the scale and other hard tissues of fishes to see their growth. *Jap. J. Ichthyol.*, 2, 156-157.
- (8) IBSEN K.H., URIST M.R., 1964. The biochemistry and the physiology of the tetracyclines with special reference to mineralized tissues. *Clin. Orthop.*, 32, 143-169.
- (9) ICHIKAWA R., HIYAMA Y., 1954. Scale growth rate of the common Goby assured by the lead acetate injection method. *Jap. J. Ichthyol.*, 3, 49-52.
- (10) JONES I.W., 1969. Notes on marking salmon fingerlings with tetracyclines. *Ann. Prog. Rept., Oregon Fish. Comm.*, 6 p.
- (11) KARIYAMA M., 1969. Studies on growth of crocodilian teeth and jaw bones by threecolour fluorescent labeling method. *J. Osaka Univ. Dent. Soc.*, 14, 17-37 (en Japonais).
- (12) KOBAYASHI S., YUKI R., FURUI T., KOSUGIYAMA T., 1964. Calcification in fish and shellfish. I — Tetracycline labeling patterns on scale, centrum and otolith in young goldfish. *Bull. Jap. Soc. Sc. Fish.*, 30, 6-13.
- (13) LOPEZ E., 1970. L'os cellulaire d'un Poisson téléostéen « *Anguilla anguilla* » L. I — Etude histocytologique et histophysique. *Z. Zell Anat. Mikr.*, 109, 552-565.
- (14) MAROIS P., MAROIS M., 1971. Action des tétracyclines sur la dent et sur l'os (Revue générale et étude expérimentale chez le rat). *Biol. Med.*, 60, 293-362.
- (15) MEUNIER F., 1972. Marquages simples et multiples du tissu osseux de quelques Téléostéens par des substances fluorescentes. *C.R. Acad. Sci.*, 275, 1 685-1 688.
- (16) MEUNIER F., BOIVIN G., 1972. Marquages multiples du tissu osseux de quelques Téléostéens à l'aide de plusieurs fluorochromes. *Bull. Soc. Zool. Fra.*, 97, 539-540.

- (17) MEUNIER F., BOIVIN G., 1974. Divers aspects de la fixation du chlorhydrate de tétracycline sur les tissus squelettiques de quelques Téléostéens. *Bull. Soc. Zool. Fra.*, 99, 495-504.
- (18) MILCH R.A., RALL D.P., TOBIE J.E., 1957. Bone localization of the tetracyclines. *J. Nat. Cancer Inst.*, 19, 87-91.
- (19) MILCH R.A., RALL D.P., TOBIE J.E., 1958. Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J. Bone Joint Surg.*, 40-A, 897-910.
- (20) OLERUD S., LORENZI G.L., 1970. Triple fluorochrome labeling in bone formation and bone resorption. *J. Bone Joint Surg.*, 52-A, 274-278.
- (21) PONLOT R., 1960. *Le radiocalcium dans l'étude des os*. Ed. Arscia, Bruxelles, 1-254.
- (22) RAHN B.A., PERREN S.M., 1971 Xylenol-Orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain Techn.*, 46, 125-129.
- (23) SIMMONS D.J., SIMMONS N.B., MARSHALL J.H., 1970. The uptake of calcium-45 in the acellular-boned toadfish. *Calc. Tiss. Res.*, 5, 206-221.
- (24) SMIRINA E.M., 1972. Annual layers in bones of *Rana temporaria*. *Zool. Zurn.*, 51, 1 529-1 534 (en russe).
- (25) SUZUKI H.K., MATHEWS A., 1968. Two color fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-bis (N-N' Dicarbomethylaminomethyl) fluorescein. *Stain Techn.*, 41, 57-60.
- (26) VAN COILLIE R., 1967. Etude à l'aide de tétracyclines de la croissance périodique des écailles de Téléostéens. *Naturaliste Can.*, 94, 29-58.
- (27) VILMANN H., 1969. The *in vivo* staining of bone with alizarin red S. *J. Anat.*, 105, 533-545.
- (28) VINCENT J., 1957. Les remaniements de l'os compact marqué à l'aide de plomb. *Rev. Bel. Path. Med. Exp.*, 26, 161-168.
- (29) WEBER D.D., RIDGWAY G.J., 1962. The deposition of tetracycline drugs in bone and scales of fish and its possible use for marking. *Progr. Fish. Cult.*, 24, 150-155.
- (30) WEBER D.D., RIDGWAY G.J., 1967. Marking pacific salmon with tetracycline antibiotics. *J. Fish Res. Board Can.*, 24, 849-865.