

**MISE EN ÉVIDENCE DE L'OSTÉOLYSE PÉRIOSTÉOCYTAIRE
VERTÉBRALE CHEZ LE SAUMON ATLANTIQUE
SALMO SALAR (SALMONIDAE, TELEOSTEI),
AU COURS DE SA MIGRATION ANADROMÉ**

par

Adnane KACEM (1, 2) & François J. MEUNIER (1, 2)

RÉSUMÉ. L'étude des surfaces des lacunes ostéocytaires a été faite sur des microradiographies d'os vertébral du saumon atlantique (*Salmo salar* L.) à diverses étapes de son cycle vital. L'augmentation significative de la taille moyenne des lacunes chez les formes adultes ($46\mu\text{m}^2$) relativement aux juvéniles, tacons et smolts ($29,3\mu\text{m}^2$) confirme la présence de processus d'ostéolyse périostéocytaire permettant de libérer du calcium. Cette ostéolyse périostéocytaire augmente également entre les saumons de montée et les saumons de frayère ($61-67\mu\text{m}^2$). Les trois processus de résorption osseuse, ostéoclasie, ostéolyse périostéocytaire et halastase sont donc présents dans le squelette du saumon.

ABSTRACT. Evidence for periosteocytic osteolysis in vertebrae of Atlantic salmon, *Salmo salar* (Salmonidae, Teleostei), during its anadromous migration.

A study of the size of osteocytic lacunae has been undertaken on microradiographs of vertebral skeleton of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at different stages of its life cycle. A significant increase of the mean size of periosteocytic lacunae in adult salmon ($46\mu\text{m}^2$) compared to parr and smolts ($29.3\mu\text{m}^2$) attests the process of periosteocytic osteolysis, which is responsible for the release of calcium. Such osteolysis increases significantly in salmon at the end of their migration compared to salmon at the beginning of their anadromous migration ($61-67\mu\text{m}^2$). We have therefore evidence for three types of bone resorption in salmon skeleton: osteoclasia, halastasy and periosteocytic osteolysis.

Keywords. Salmonidae - *Salmo salar* - Migration - Vertebrae - Periosteocytic osteolysis.

Les écailles des téléostéens peuvent représenter un pool de calcium important (Simkiss, 1974) jusqu'à 20% du poids de calcium total de l'organisme et constituent donc, de ce fait, un réservoir qui peut être utilisé en cas de besoin (Mugiya, 1980). Pour de nombreux auteurs, seules les écailles joueraient un rôle de réservoir de calcium chez les téléostéens (Mugiya et Watabe, 1977; Carragher et Sumpter, 1991; Persson, 1997). Ce calcium est recyclé dans le milieu intérieur par suite de processus d'érosion ostéoclastique (Persson *et al.*, 1994, 1995, 1997, 1999). Chez l'anguille, *Anguilla anguilla*, où la composante écailleuse est fortement réduite (Zylberberg *et al.*, 1984), les besoins en calcium sont, au moins en partie, assurés par le squelette et notamment les vertèbres, tout au moins lors de la maturation génitale (Lopez, 1973). Takagi (1990) et Takagi et Yamada (1993) montrent que chez le tilapia (*Oreochromis niloticus*), une participation du squelette à la fourniture de

(1) Laboratoire d'Ichtyologie générale et appliquée, FR CNRS 1451, Muséum national d'histoire naturelle, 43 rue Cuvier, 75231 Paris cedex 05, FRANCE. [kacem@mnhn.fr] [meunier@mnhn.fr]

(2) Équipe de Recherche "Formations squelettiques", UMR CNRS 8570, Laboratoire d'Anatomie comparée, Université D. Diderot, 75251 Paris cedex 05, FRANCE.

calcium peut avoir lieu simultanément à celle des écailles. Chez le saumon atlantique, le calcium nécessaire aux activités physiologiques lors de la migration anadrome, qui est une période de jeûne (Flemming, 1996), provient soit des écailles (Crichton, 1935; Van Someren, 1937), soit du squelette vertébral (Kacem *et al.*, 1998, 2000). La destruction des structures minéralisées est assurée par les ostéoclastes (Kacem *et al.*, 1998), mais une déminéralisation diffuse du squelette a également été mise en évidence (Kacem *et al.*, 1998; Kacem, 2000).

Chez les mammifères, les ostéocytes peuvent résorber les parois de leurs lacunes (composante minérale et organique) (Baud, 1968; Baud et Boivin, 1978a, 1978b; Nijweide *et al.*, 1996). C'est ce qu'on appelle l'ostéolyse périostéocytaire ou "osteocytic osteolysis" (Belanger, 1969) dont le résultat est une augmentation significative du volume de la lacune ostéocytaire. Un tel processus a, par ailleurs, été mis en évidence lors de la maturation génitale expérimentale chez l'anguille (Lopez, 1973). Il a également été décrit chez la vipère gestante *Vipera aspis* L. (Alcobendas et Baud, 1988; Alcobendas *et al.*, 1991). Compte tenu de l'importance des processus de résorption du squelette par ostéoclasie (Kacem *et al.*, 1998) et de déminéralisation par halastase (Kacem *et al.*, 2000) mis en évidence chez le saumon atlantique, nous avons voulu vérifier la présence éventuelle de la résorption périostéocytaire chez cette espèce. Pour cela, nous avons quantifié, à l'aide de l'analyse d'images, la taille des lacunes périostéocytaires sur des microradiographies d'os vertébral de saumons mâles et femelles à différents stades de leur développement et de leur migration anadrome.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Pour dénombrer et mesurer la surface des lacunes ostéocytaires, nous avons utilisé six femelles (3 de montée et 3 de frayère) et 6 mâles (3 de montée et 3 de frayère) ainsi que 3 juvéniles (1 tacon mâle, 1 tacon femelle et 1 smolt). Les trois juvéniles sont utilisés comme témoins, chez lesquels la très grande majorité des ostéocytes ne sont pas en phase ostéolytique. Les mesures ont été faites sur la vertèbre n°41 (voir Kacem *et al.*, 1998 pour plus de détails).

Les vertèbres, préalablement déshydratées et dégraissées, sont incluses dans le stratyl puis coupées en tranches de 125 μm à l'aide d'une tronçonneuse à disque diamanté "Leica". Les coupes de 125 μm ont été ensuite amincies manuellement jusqu'à une épaisseur de 20 μm , selon la méthode décrite par Jowsey *et al.* (1965), en utilisant deux plaques de verre préalablement dépolies à l'aide d'une poudre abrasive à grain fin. Des microradiographies de ces coupes ont été réalisées à l'aide du générateur CGR Sigma 2060 et à très courte distance de la source pour obtenir un contraste maximum. Nous avons utilisé un film de haute résolution (Kodak HRP SO 343) sous un rayonnement X de 10 μV de tension pour une intensité de 5 μhA . La durée d'exposition est de 5 minutes pour une distance entre le film et le foyer des rayons X égale à 5 μm . Les microradiographies sont saisies avec un microscope Zeiss équipé d'une caméra vidéo SONY CCD-Iris-RGB, elle-même reliée à un ordinateur. Les microradiographies sont numérisées avec le logiciel ProTV puis traitées avec le logiciel NIH-Image 1.61/fat. Avec ce logiciel, nous mesurons la surface précise de la lacune qui paraît noire sur un fond gris.

La discrimination entre les lacunes ostéocytaires normales et celles qui sont bordées d'un halo de déminéralisation sur toute une coupe est une opération très délicate et dépend de l'orientation du plan de coupe. En effet, dans les secteurs étudiés les ostéocytes

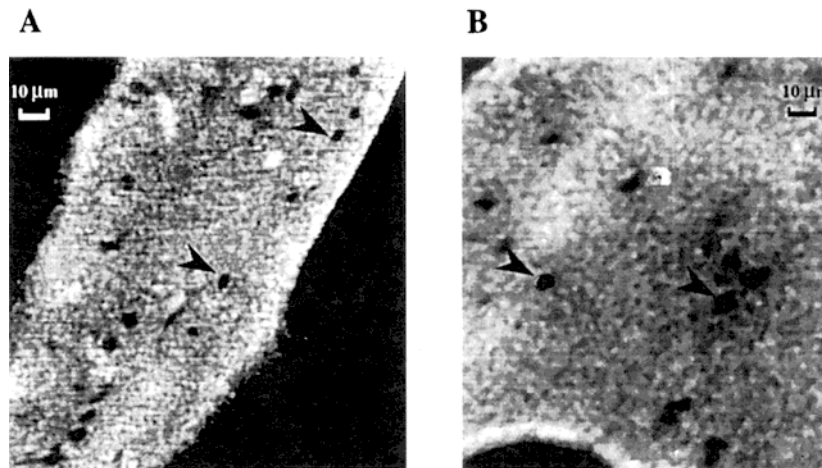


Fig. 1. Microradiographies de coupes de vertèbres (20 μ m) de *Salmo salar*. Flèches \blacktriangleright lacunes ostéocytaires. **A**: Tacon, longueur fourche (LF) = 125 mm. **B**: Saumon après reproduction, LF = 695 mm. [Microradiographs of ground sections of vertebrae (20 μ m-thick). Arrow \blacktriangleright osteocytic lacunae. **A**: Parr, fork length (LF) = 125 mm. **B**: Salmon after spawning, LF = 695 mm.]

seulement la variation de la surface totale d'une cinquantaine de lacunes ostéocytaires prises au hasard dans chaque coupe. Il est ainsi possible d'obtenir une valeur moyenne de la surface ostéocytaires ainsi qu'une distribution des différentes tailles des ostéocytes. Les mesures obtenues sont portées sur des histogrammes dont le pas est de 15 μ m².

Chaque histogramme présente le pourcentage de lacunes ostéocytaires, dans un intervalle de surface donné. La surface moyenne des lacunes ostéocytaires a été calculée pour chaque stade de migration. Une analyse de variance (Test ANOVA, Statview 4.2) a été effectuée afin de déterminer la variation des surfaces des lacunes ostéocytaires en fonction du stade de migration et du sexe.

RÉSULTATS

Sur les images microradiographiques des saumons adultes, on remarque qu'il existe des lacunes ostéocytaires bordées par des halos de déminéralisation aux contours crénelés; c'est le résultat de l'ostéolyse ostéocytaires. D'autres lacunes, de taille plus faible en général, ne présentent pas de halos et leurs parois sont régulières et nettes; la lacune est donc occupée par un ostéocyte normal non en activité ostéolytique. Une telle activité ostéolytique est pratiquement inexistante chez les juvéniles.

Un examen comparatif des microradiographies au microscope montre que les lacunes ostéocytaires sont globalement plus grandes chez les saumons de montée que chez les juvéniles (Fig. 1), ce que confirme l'analyse d'images.

La surface des lacunes périostéocytaires mesurées sur les coupes de vertèbres des saumons à différents stades de leur migration est représentée sur les cinq histogrammes de la figure 2. Chaque stade de migration s'avère significativement distinct des autres ($p < 0,0001$). L'analyse en fonction des stades donne les résultats suivants:

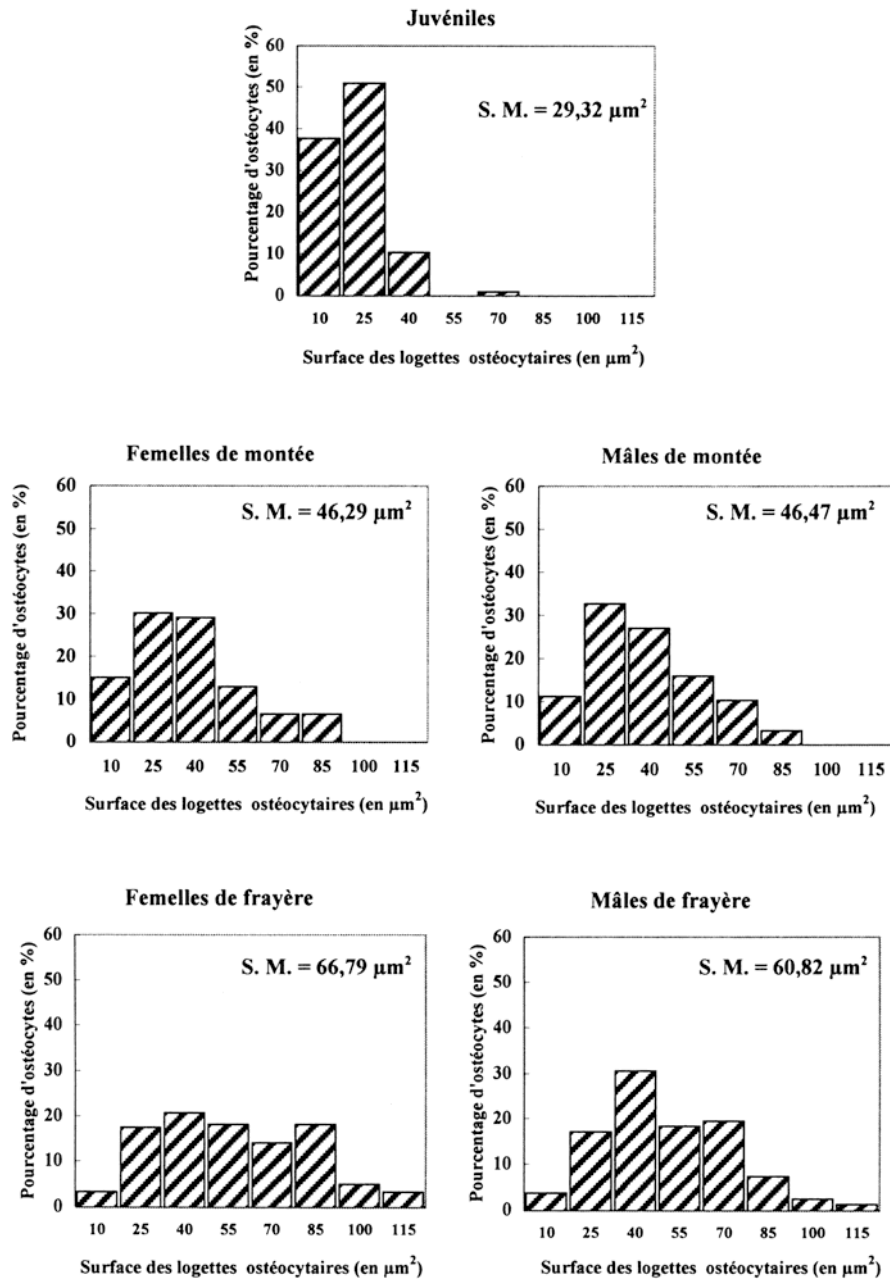


Fig. 2. Variations de la surface des lacunes ostéocytaires par intervalle de surface (en μm^2) sur les vertèbres de saumons sauvages en fonction du sexe et du stade de migration. S.M.: surface moyenne des lacunes ostéocytaires. [Variations of the surface (in μm^2) of osteocytic lacunae in vertebrae of wild salmon according to the sex and the stage of migration. S.M.: mean surface of osteocytic lacunae.]

Chez les juvéniles, il n'y a pas de différence significative entre les tacons mâle et femelle, et le smolt. On a donc choisi de regrouper ces trois spécimens sur le même histogramme. Près de 99% de ces lacunes ont une surface comprise entre 25 et 55 μm^2 . La surface moyenne des lacunes ostéocytaires chez les juvéniles est de 29,3 μm^2 . Par ailleurs, les parois des lacunes étant régulières et nettes, nous admettrons que les cellules correspondantes sont des ostéocytes non en activité ostéolytique. Quelques ostéocytes (soit 1%) ont une surface comprise entre 70 à 85 μm^2 ; nous les considérons comme des ostéocytes en ostéolyse.

Pour les saumons de montée, les lacunes ostéocytaires ont une surface moyenne de 46 à 46,5 μm^2 . Aucune différence significative de la taille des lacunes ostéocytaires n'a été mise en évidence entre les sexes ($p > 0,05$). Le pourcentage des lacunes de diamètre compris entre 25 et 55 μm^2 est de 87% avec un maximum de surface qui peut atteindre 110 μm^2 . Les saumons de frayère présentent, en moyenne, les surfaces de lacunes les plus grandes avec des parois irrégulières; certaines lacunes ostéocytaires peuvent même atteindre 115 à 130 μm^2 . Le pourcentage de lacunes "normales" n'est que 69% pour les mâles et 59% pour les femelles. De plus, chez les femelles, les lacunes ont une surface moyenne de 67 μm^2 , significativement plus élevée de près de 6 μm^2 (soit 9%), que celles mesurées chez les mâles (61 μm^2).

DISCUSSION

Dans de précédents travaux sur l'anguille (Lopez, 1973; Peignoux-Deville, 1978) et sur la vipère (Alcobendas, 1989), l'ostéolyse ostéocytaire est exprimée en pourcentage d'ostéocytes ostéolytiques par rapport au nombre total d'ostéocytes. Les ostéocytes ostéolytiques sont ceux qui sont entourés d'un halo de déminéralisation, c'est-à-dire d'une zone appauvrie en minéral qui apparaît alors d'une teinte plus sombre que l'os normal. Le générateur de rayons X utilisé dans notre travail ne permet pas d'avoir un contraste suffisamment fin et précis pour distinguer de tels ostéocytes sans ambiguïté. Pour bien discerner les lacunes avec halo de celles qui en sont dépourvues, il fallait utiliser un générateur qui donne un rayonnement X de faible énergie (3 à 5 kV et 1,5 à 2 mA) impliquant l'utilisation d'une chambre à vide, non disponible dans notre laboratoire. Cependant, l'observation et l'analyse des surfaces des lacunes, sur les microradiographies des lames minces de 20 μm d'épaisseur, nous ont fourni des résultats préliminaires convaincants en faveur du processus d'ostéolyse périostéocytaire sur les vertèbres de saumon. Les mesures effectuées à partir des microradiographies montrent qu'au cours de la migration anadrome, les vertèbres du saumon subissent une augmentation significative de la taille moyenne des lacunes périostéocytaires mettant ainsi en évidence un phénomène significatif d'ostéolyse périostéocytaire. La comparaison des histogrammes de distribution des fréquences de taille des lacunes ostéocytaires des vertèbres, confirme la réduction du nombre des lacunes de petite taille au profit de lacunes de grande taille. Ceci entraîne le déplacement de la taille moyenne de ces lacunes vers des valeurs plus élevées, au cours du cycle du saumon, pour atteindre un maximum à la fin de la migration anadrome (après la reproduction). L'ostéolyse périostéocytaire a comme conséquence la remise en circulation des substances minérales et organiques dans le système canaliculaire et peut ainsi répondre à une demande accrue de calcium chez des saumons qui sont soumis à un jeûne strict au cours de leur migration anadrome. La libération de calcium au niveau du squelette du saumon peut donc, comme c'est le cas chez l'anguille (Lopez, 1973), faire intervenir le processus

d'ostéolyse périostéocytaire en synergie avec l'ostéoclasie (Kacem *et al.*, 1998) et l'hâlastasie (Kacem *et al.*, 2000; Kacem, 2000).

Nos résultats montrent également qu'il n'y a pas de différence significative entre les surfaces ostéocytaires mesurées au niveau du corps vertébral du tacon mâle et celles qui ont été mesurées sur le tacon femelle et le smolt. La maturation sexuelle des tacons mâles ne semble pas avoir d'action sur la résorption périostéocytaire alors qu'elle a une action significative sur la résorption ostéoclastique et sur la déminéralisation diffuse (Kacem, 2000). Ce résultat doit toutefois être confirmé sur un nombre plus important de tacons mâles spermiant et, dans la mesure du possible, par comparaison avec des tacons mâles et femelles non matures. De la même façon, il faut étendre cette étude de l'ostéolyse périostéocytaire aux autres parties du squelette, tout particulièrement aux dentaires des mâles adultes pour vérifier si, à côté des processus d'ostéogenèse (Kacem, 2000), conduisant à la formation du "bec" (Fleming, 1996), il y a ou non une activité ostéolytique des ostéocytes. En effet, le degré de minéralisation moyen de l'os cortical des dentaires est plus faible que celui de l'os normal (Kacem, 2000).

La destruction du tissu osseux par les ostéocytes est d'abord extracellulaire puis intracellulaire (Fuller et Chambers, 1995; Nijweide *et al.*, 1996). La substance minérale est dissoute en premier grâce à l'action de l'acide lactique. Puis, la destruction de la matrice organique se fait par l'intermédiaire des enzymes protéolytiques contenus dans les lysosomes, organites cellulaires particulièrement abondants dans les ostéocytes ostéolytiques (Baud et Dupont, 1965; Baud, 1968; Lopez, 1973). Il serait donc intéressant de vérifier, en microscopie électronique à transmission, la présence de changements significatifs dans l'organisation intracellulaire des ostéocytes (augmentation du nombre de lysosomes, développement de microvillosités, etc.) en relation avec l'activité ostéolytique, sur des saumons en cours de migration anadrome.

Remerciements. Nous remercions J.L. Baglinière, N. Jeannot, É. Prévost et F. Marchand qui nous ont aidés à la collecte des saumons au Moulin des Princes à Pont-Scorff et O. Babiar pour l'aide qu'il a apportée à la réalisation des coupes de 20 µm.

RÉFÉRENCES

- ALCOBENDAS M., 1989. Recherches sur le métabolisme phosphocalcique au cours du cycle annuel et du cycle de la reproduction chez un reptile, *Vipera aspis* (L.) (Ophidia, Viperidae). Thèse de doctorat, 235 p. Univ. Paris VII.
- ALCOBENDAS M. & C.A. BAUD, 1988. Effets des hormones péricunaires de déminéralisation de l'os cortical chez *Vipera aspis* (L.) (Reptilia, Ophidia) dans diverses conditions physiologiques. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 307, III: 177-181.
- ALCOBENDAS M., BAUD C.A. & J. CASTANET, 1991. Structural changes of the periosteocytic area in *Vipera aspis* (L.) (Ophidia, Viperidae) bone tissue in various physiological conditions. *Calc. Tiss. Inter.*, 49: 53-57.
- BAUD C.A., 1968. Structure et fonctionnement des ostéocytes dans les conditions normales et sous l'influence de l'extrait parathyroïdien. *Schweiz. Med. Wschr.*, 98: 717-720.
- BAUD C.A. & G. BOIVIN, 1978a. Effects of hormones on osteocyte function and perilacunar wall structure. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 136: 270-281.
- BAUD C.A. & G. BOIVIN, 1978b. Modifications of the perilacunar walls resulting from the effect of fluoride on osteocytic activity. *Metab. Bone Dis. Rel. Res.*, 1: 49-54.

- BAUD C.A. & D. DUPONT, 1965. **Le** remaniement osseux périlacunaire. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 260, III: 1483-1484.
- BELANGER L.F., 1969. **Osteocytic** osteolysis. *Calc. Tiss. Res.*, 4: 1-12.
- CARRAGHER J.F. & P. SUMPTER, 1991. **The** mobilization of calcium from calcified tissues of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced to synthesize vitellogenin. *Comp. Biochem. Phys.*, 99A: 169-172.
- CRICHTON M.I., 1935. **Scale**-absorption in salmon and sea trout. *Fish. Brd. Scot., Salm. Fish.*, 4: 1-8.
- FLEMING I.A., 1996. **Reproductive** strategies of Atlantic salmon: Ecology and evolution. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 6: 379-416.
- FULLER K. & T.J. CHAMBERS, 1995. **Localisation** of mRNA for collagenase in osteocytic bone surface and chondrocytic cells but not osteoclasts. *J. Cell Sci.*, 108: 2221-2230.
- JOWSEY J., KELLY P.J., RIGGS B.L., BIANCO A.J., SCHOLZ D.A. & J. GERSHON-COHEN, 1965. **Quantitative** microradiographic studies of normal and osteoporotic bone. *J. Bone Joint. Surg.*, 47(A): 785-806.
- KACEM A., 2000. **Transformations** morphologiques et histologiques du squelette du saumon atlantique (*Salmo salar* L.) au cours de son cycle vital. Thèse de doctorat. 136p. MNHN, Paris.
- KACEM A., MEUNIER F.J. & J.L. BAGLINIÈRE, 1998. **A** quantitative study of morphological changes in the skeleton of *Salmo salar* during its anadromous migration. *J. Fish Biol.*, 53: 1096-1109.
- KACEM A., GUSTAFSSON S. & F.J. MEUNIER, 2000. **Demineralization** of the vertebral skeleton in Atlantic salmon *Salmo salar* L. during spawning migration. *Comp. Biochem. Phys.*, 125A: 479-484.
- LOPEZ E., 1973. **Étude** morphologique et physiologique de l'os cellulaire des poissons téléostéens. *Mém. Mus. natl. Hist. nat.*, 80: 1-90.
- MUGIYA Y. & N. WATABE, 1977. **Studies** on fish scale formation and resorption. II. Effect of estradiol on calcium homeostasis and skeletal tissue resorption in the Goldfish, *Carassius auratus*, and the Killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Phys.*, 57A: 197-202.
- MUGIYA Y., 1980. **The** source of calcium in regenerating scales of the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Phys.*, 66A: 521-524.
- NIJWEIDE P.J., BURGER E.H., NULEND J.K. & A. VAN DER PLAS, 1996. **The** osteocyte. In: Principles of Bone Biology (Bilezikien J.P., Rais L.G. & G.A. Rodan, eds), pp. 115-126. San Diego: Academic Press.
- PEIGNOUX-DEVILLE J., 1978. **Rôle** du corps ultimobranchial (C.U.B.) dans la régulation du métabolisme calcique chez les poissons téléostéens. *Mém. Mus. natl. Hist. nat.*, 108: 1-71.
- PERSSON P., 1997. **Calcium** regulation during sexual maturation of female Salmonids: Estradiol 17 β and calcified tissues (Department of Physiology, ed.). Thesis of Göteborg Univ., Sweden.
- PERSSON P., SUNDELL K. & B.T. BJÖRNSSON, 1994. **Estradiol-17 β** -induced calcium uptake and resorption in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Phys. Biochem.*, 13: 379-386.
- PERSSON P., TAKAGI Y. & B.T. BJÖRNSSON, 1995. **Partrate** resistant acid phosphatase as a marker for scale resorption in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Effects of estradiol 17 β traitement and refeeding. *Fish Phys. Biochem.*, 14: 329-339.
- PERSSON P., JOHANNSSON S.H., TAKAGI Y. & B.T. BJÖRNSSON, 1997. **Estradiol 17 β** and nutritional status affect calcium balance, scales and bone resorption, and bone formation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Comp. Phys.*, 54: 669-684.
- PERSSON P., BJÖRNSSON B.T. & Y. TAKAGI, 1999. **Characterization** of morphology and physiology actions of scale osteoclasts in rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 54: 669-684.
- SIMKISS K., 1974. **Calcium** metabolism of fish in relation to ageing. In: Ageing of Fish (Bagenal, ed.), pp. 1-12. Unwin Brothers.
- TAKAGI Y., 1990. **Studies** on the dynamics of bone and scale metabolism in teleosts, with special reference to their calcium homeostasis. PhD Thesis, Hokkaido Univ., Japan.
- TAKAGI Y. & J. IYAMADA, 1993. **Changes** in metabolism of acellular bone in Tilapia, *Oreochromis niloticus*, during deficiency and subsequent repletion of calcium. *Comp. Biochem. Phys.*, 105A: 459-462.

- VAN SOMEREN V.D., 1937. \square preliminary investigation into the causes of scale absorption in Salmon (*Salmo salar* L.). *Fish. Brd. Scot., Salm. Fish.*, 11: 1-11.
- ZYLBERBERG L., MEUNIER F.J., ESCAIG F. & S. HALPERN, 1984. \square Données nouvelles sur la structure et la minéralisation des écailles d'*Anguilla anguilla* (Osteichthyes, Anguillidae). *Can. J. Zool.*, 62: 2482-2494.

Reçu le 01.04.2000.

Accepté pour publication le 30.08.2000.