Rev. Fr. Histotechnol., 2009, **22**, n° 1, p. 23 à 47

L'INTERET DES ECAILLES ELASMOÏDES DES TELEOSTEENS POUR LA MISE EN ŒUVRE DES TECHNIQUES HISTOLOGIQUES, ULTRASTRUCTURALES, IMMUNOLOGIQUES ET APPORT DE CES TECHNIQUES A L'OBSERVATION DE LA STRUCTURE DE CES ECAILLES

*LOUISE ZYLBERBERG

*louise.zylberberg@upmc.fr

Université Pierre et Marie Curie CNRS UMR 7193, ISTP,
Equipe Biominéralisations et Paléoenvironnements
4, place Jussieu BC 19, 75242Paris Cedex 05

CET ARTICLE EST DEDIE A LA MEMOIRE DE FRANÇOISE ALLIZARD

INTRODUCTION

Le groupe des Téléostéens ou poissons osseux, connus depuis le Trias (environ - 245 millions d'années) représente le groupe de poissons le plus important, avec environ vingt-cinq mille espèces, à peu près autant que tous les autres Vertébrés réunis. Les téléostéens se trouvent dans tous les milieux aquatiques, marins, saumâtres ou dulçaquicoles, dans les zones abyssales comme dans les torrents de montagnes, sous les tropiques comme dans les régions polaires. La grande diversité morphologique, biologique, écologique de ce groupe concerne également leur revêtement écailleux qui peut prendre des couleurs, des formes spectaculaires illustrées dans des ouvrages anciens comme ceux de Belon du Mans (1, 2). Les études consacrées à la morphologie des écailles en vue de leur classification débutent au 19ème siècle (3, 4, 5). Le revêtement écailleux fait de plaques osseuses, rigides ou souples a plusieurs rôles: protection, souplesse et hydrodynamisme (6). Selon la définition des écailles établie par Bertin (7) encore valide aujourd'hui, les écailles élasmoïdes sont de minces plaques, flexibles, imbriquées, minéralisées, de structure lamellaire. Dans le domaine halieutique, l'intérêt pour les écailles élasmoïdes s'est accru depuis la fin du 19ème siècle (8), en raison du développement de la scalimétrie: détermination de l'âge individuel en fonction des marques de croissance sur les écailles (9). Les marques de croissance des écailles apparaissent sous forme d'anneaux sombres, les *annuli*, observables au microscope optique sans aucune préparation grâce à la transparence des écailles. Les corrélations entre le nombre d'*annuli* et l'âge individuel d'un poisson sont utilisées pour établir les classes d'âges dans les populations

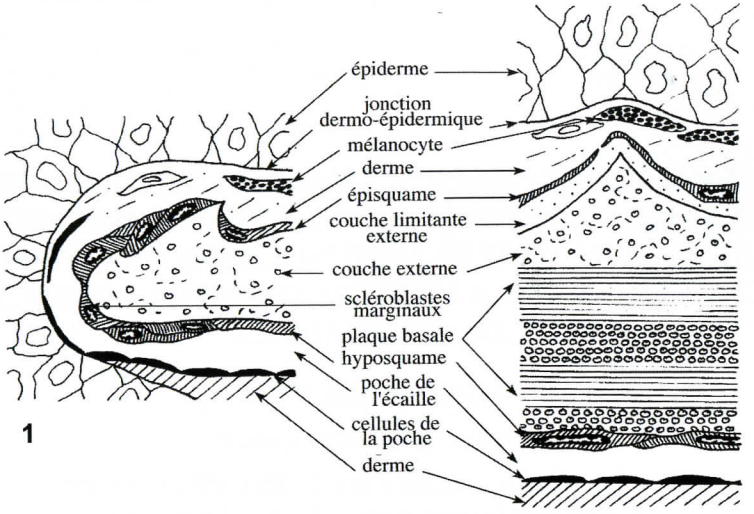


Figure 1. Schéma d'une coupe perpendiculaire à la surface de l'écaille.

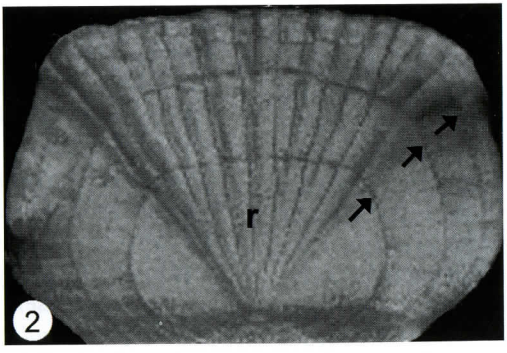


Figure 2. Ecaille entière de daurade *Sparus aurata* montrant 3 anneaux d'arrêt de croissance. Ces marques annuelles (flèches) indiquent que le poisson était âgé de 3ans. r : radii dans le champ postérieur de l'écaille.

de poissons. Plus récemment, le rôle des écailles dans la biohydrodynamique des poissons a suscité un nouvel intérêt (6). La mise en œuvre de techniques récentes consacrées à l'identification des constituants des écailles notamment à leur constituant organique majeur, le collagène et sa minéralisation complètent les anciennes données le plus souvent descriptives. Les écailles apparaissent comme un outil de choix pour certaines de ces techniques non seulement en raison de leur transparence qui permet leur observation sans préparation en microscopie à lumière (10) mais aussi parce que leur prélèvement ne nuit pas à la survie du poisson. De plus, les écailles ont la faculté de régénérer, toute écaille perdue naturellement ou expérimentalement est remplacée par une écaille régénérée. Les écailles normales et régénérées présentent le même plan général d'organisation. (11 à 16).

RAPPEL DE LA STRUCTURE DES ÉCAILLES ÉLASMOÏDES

Les écailles élasmoïdes sont insérées dans le derme, sous l'épiderme. Chaque écaille est contenue dans une poche: le sac de l'écaille. Les écailles se chevauchant à la manière des tuiles d'un toit, leur surface comporte deux parties: une partie découverte, le champ postérieur et une partie recouverte par les écailles adjacentes. Ces deux champs portent des crêtes circulaires, les *circuli* qui entourent le centre ou foyer de l'écaille d'où partent des sillons radiaires les *radii*.

Selon l'aspect du champ postérieur, les écailles élasmoïdes sont divisées en deux catégories : les écailles élasmoïdes cycloides dont le bord postérieur est lisse et les écailles élasmoïdes cténoïdes dont la partie postérieure porte des spicules, les *cteni*.

Les écailles sont composées de trois couches superposées. La partie la plus importante est la couche profonde ou plaque basale constituée d'un empilement de strates. Chaque strate est composée des fibrilles de collagène parallèles entre elles. Leur orientation varie d'une strate à l'autre à la manière d'un contreplaqué. La plaque basale est partiellement minéralisée. Elle est couverte par la couche osseuse qui comprend la couche externe formée par un réseau de fines fibrilles de collagène minéralisé (15, 16). C'est la première couche formée et la première minéralisée au cours de l'ontogenèse d'une écaille, la seule présente dans les parties marginales des écailles. La couche externe est elle-même couverte totalement ou partiellement par la couche limitante externe minéralisée. Les cellules de l'écaille appelées scléroblastes (5) sont disposées à la périphérie de l'écaille. Elles sont réparties en fonction des reliefs à la surface externe de l'écaille alors qu'elles forment un pseudo-épithelium continu bordant la partie profonde de la plaque basale (figure 1).

TECHNIQUES

Observations sans préparation

Les observations sont effectuées le plus souvent en vue d'études de populations par scalimétrie, méthode basée sur l'évaluation de l'âge des poissons à partir des écailles. Chez la plupart des téléostéens, les écailles élasmoïdes sont suffisamment transparentes pour être observées au microscope optique sans préparation. Des anneaux sombres (figure 2) correspondent à des périodes d'arrêt de croissance qui sont le plus souvent annuelles, les écailles étant comme toutes les pièces du squelette des enregistreurs de la vie des individus. La chronologie d'apparition de ces marques de croissance est utilisée

pour l'estimation de l'âge individuel des poissons. La scalimétrie est une méthode rapide, non destructrice et peu onéreuse, elle s'avère donc une méthode utile pour établir la répartition des individus en classes d'âge. Néanmoins, cette méthode requiert des conditions d'observation et un traitement des données rigoureusement standardisés et une validation rigoureuse des méthodes utilisées (9). L'évaluation des populations est nécessaire pour la connaissance de la biologie et la dynamique des populations naturelles ou exploitées. Cette évaluation est indispensable pour les populations d'espèces à importante valeur alimentaire pour prévenir des prélèvements trop intensifs mettant en péril ces espèces.

Marquages vitaux

Principe de la méthode : Cette méthode permet de distinguer les tissus minéralisés formés avant, pendant et après l'administration d'une substance colorée ou fluorescente incorporée par le tissu en cours de minéralisation. Cette substance ne doit présenter ni toxicité générale, ni inhiber la minéralisation (17).

Les marquages successifs en utilisant la même substance ou des substances différentes (18) permettent de déterminer la quantité de tissu minéralisé formé en un temps donné et de suivre des variations de vitesse de formation de tissus minéralisés.

Principales substances utilisées :

Tétracycline, sous forme de chlorhydrate à 1% dans une solution de NaCl à 6 ‰ injection à raison de 50 mg/kg. Fluorescence jaune.

Fluorescéine à 2% dans une solution de bicarbonate de soude à 2 %, injection à raison de 30 à 40 mg/kg. Fluorescence jaune-vert.

Alizarine à 1,6 % dans une solution de NaCl à 6 ‰ à raison de 80 mg/kg. Fluorescence rouge.

Orange de xylélol à 3 % dans une solution aqueuse injection à raison de 90 mg/kg. Fluorescence rouge.

L'administration des marqueurs se fait de différentes façons: par injection intrapéritonéale ou intramusculaire, par immersion des animaux dans la solution contenant le marqueur, par incorporation dans la nourriture.

Coloration in toto par le rouge d'alizarine

Le rouge d'alizarine se fixe sur les sels de calcium. Cette coloration appliquée sur les écailles entières révèle la répartition des zones calcifiées.

Les écailles sont prélevées une à une, fixées dans le formol, éclaircies par une solution de potasse et colorées par une solution d'alizarine préparée selon la technique de Taning (19).

Les écailles les plus minces peuvent être déshydratées, éclaircies par le benzène et montées dans une résine entre lame et lamelle pour l'examen au microscope optique.

Lames minces pour observation en lumière polarisée

Les écailles sont préservées dans l'alcool éthylique à 70°, incluses dans une résine polyester.

Les blocs sont débités en tranches au moyen d'une tronçonneuse à disque diamanté. Les tranches obtenues sont usées au moyen de papiers abrasifs de grains décroissants puis polies sur velours avec de la poudre d'alumine pour obtenir des lames minces d'une épaisseur de l'ordre de 250μm. Les lames minces obtenues sont observées

en lumière polarisée pour définir l'angle de rotation entre les différentes strates de fibrilles de collagène de la plaque basale et déterminer le type de contreplaqué orthogonal lorsque la direction des fibrilles varie d'un angle de 90° d'une strate à l'autre ou torsadé lorsque cet angle est différent.

Techniques histologiques et histochimiques

Les techniques de routine de l'histologie s'appliquent aux écailles (20). La fixation par le mélange de Bouin aqueux et l'inclusion à la paraffine donnent de bons résultats. La fixation d'un fragment de peau contenant les écailles est préférable à celle d'écailles isolées qui ont tendance à s'enrouler lors de la fixation et la déshydratation et deviennent plus difficiles à couper. Or, les difficultés majeures concernent la confection des coupes car les écailles ont tendance à se détacher de la coupe. Incluses dans des poches individuelles, elles ne sont reliées aux tissus avoisinants que par leur partie postérieure. De plus, leur structure hétérogène accroît les difficultés. La confection des coupes est améliorée en immergeant un bloc déjà entamé dans de l'eau courante ou dans un réfrigérateur pendant un délai de un à plusieurs jours.

La plupart des techniques topographiques : trichrome en un temps, trichrome de Masson, trichrome de Prenant rapide, Azan donnent de bons résultats ainsi que les détections histochimiques des polysaccharides (Acide Périodique de Schiff (APS), bleu alcian) des protides (tétrazoréaction de Danielli). Le mode d'emploi des différentes techniques utilisées figure dans l'ouvrage de Gabe (21).

Détection du calcium. La recherche du calcium est effectuée par la méthode de substitution : Réaction de von Kossà.

Les coupes histologiques sont traitées par une solution de nitrate d'argent à 2,5% à l'obscurité. La réduction des sels d'argent peut se faire à la lumière ou par une solution d'hydroquinone à 0,5% qui donne des résultats plus lisibles. Les parties de l'écaille contenant des sels de calcium sont mises en évidence en noir.

Une contre-coloration est possible : soit une coloration des noyaux par une laque aluminique rouge comme le rouge nucléaire solide, soit par des colorants de la famille des thiazines comme le bleu de toluidine, le bleu de méthylène, les azurs.

La réaction aux sels d'argent n'est pas spécifique du calcium mais ce procédé a une valeur localisatrice utile pour des recherches sur la calcification.

Microscopie électronique à balayage (MEB)

Cette technique permet de mettre en évidence les reliefs de la surface des écailles (22, 23). La préparation des écailles est la suivante : une fois prélevées, les écailles sont fixées dans une solution à 10% de formol, nettoyées par une solution à 1% d'hypochlorite de sodium qui dissout les tissus non minéralisés. Après un rinçage à l'eau distillée, les écailles sont séchées soigneusement à plat, pour les écailles très minces et peu minéralisées, le séchage se fait entre deux lames de verre. La distribution des strates de la plaque basale s'effectue sur des écailles congelées puis cassées dans l'azote liquide et séchées.

Toutes les écailles sèches sont recouvertes d'une couche métallique, le plus souvent il s'agit d'un dépôt d'or.

La MEB est utilisée pour observer les microreliefs : crêtes, *cteni*, de la surface des écailles, et la surface profonde minéralisée

de la plaque basale au niveau du front de minéralisation. L'organisation du contre-plaqué formé par les fibrilles de collagène de la plaque basale est observée sur les plans de fracture.

Microscopie électronique à transmission (MET)

Fixation chimique

La fixation utilise le glutaraldéhyde soit seul soit en mélange avec le formaldehyde dans un tampon cacodylate ou phosphate 0,1 M final à pH 7,2, suivie d'une post-fixation dans l'acide osmique à 1 ou 2 % dans le même tampon. La déshydratation par des alcools éthyliques est suivie d'un passage dans l'oxyde de propylène qui facilite le débitage en coupes ultra-minces.

Les inclusions sont faites dans l'épon avec un passage dans l'étuve à 60°C sous vide pendant au moins 4 heures précédant l'inclusion définitive.

Cryofixation ultra-rapide et cryosubstitution

L'avantage pour les tissus calcifiés de la cryofixation suivie de cryosubstitution est d'éviter le passage par une solution aqueuse qui dissout au moins partiellement les sels de calcium.

Cryofixation

Cryofixation ultra-rapide s'effectue par application de l'écaille contre une surface polie d'un bloc de métal refroidi par de l'hélium liquide (24). En raison de leur faible épaisseur, les écailles se prêtent à ce mode de fixation qui fournit de grandes surfaces bien préservées mais sur une faible épaisseur (20μm).

Des échantillons de petite taille (3 mm de côté) placés sur un coussin de mousse collé sur un disque d'acier sont projetés sur un disque de cuivre ultra pur refroidi par l'hélium liquide.

Les échantillons sont recueillis et conservés dans de l'azote liquide avant d'être déshydratés.

Cryosubstitution

L'eau des tissus, sous forme de glace, est remplacée par un solvant organique.

Le bain de cryosubstitution est constitué par de l'acétone pur à -86°C ou contenant un fixateur chimique (aldéhydes ou tétroxyde d'osmium). Un tamis moléculaire, (molecular sieves, Union Carbide) ajouté à ce bain, piège l'eau au fur et à mesure que la température du bain de solvant augmente par paliers: premier palier à -30°C, deuxième palier à la température du laboratoire (25).

Les pièces sont transférées dans l'oxyde de propylène et incluses dans une résine: épon ou LR white.

Cryofracture

La cryofracture, technique complémentaire des cryofixation et cryosubstitution est utilisée pour l'observation de structures intramembranaires, intracellulaires ou intercellulaires (26). Les observations sont faites à partir d'échantillons fixés chimiquement et cryoprotègés par un passage dans un bain de glycérol à 25%. Les fractures sont effectuées selon la technique du "sandwich". Les échantillons placés dans des coupelles de cuivre sont congelés dans l'azote. Les coupelles sont mises dans un porte-objet de fracture place sur la platine refroidie à –150°C (azote liquide) de l'appareil de cryofracture sous vide (10^{-6} Torr). La fracture de l'échantillon est obtenue par l'ouverture du porte-objet. Une couche de carbone et de platine obtenue par vaporisation est dépo-

sée sur les répliques sous un angle de 45° permettant l'observation de reliefs des deux surfaces membranaires.

Confection des coupes ultrafines pour la MET

La confection de coupes ultrafines est rendue difficile en raison de l'hétérogénéité de la plaque basale, partie la plus épaisse de l'écaille qui le plus souvent est au moins partiellement minéralisée. Le fil du rasoir de diamant coupe les fibrilles de collagène de la plaque basale sous des angles variant d'une strate à l'autre. L'orientation du bloc indiqué sur le schéma de la figure 3 semble palier les difficultés de confection des coupes (27).

Hybridation* in situ *collagènes de types I et V

Les types de collagènes fibrillaires présents dans les écailles du poisson rouge *(Carassius auratus)* ont été identifiés en mettant en évidence l'expression de leur mARN à défaut de pouvoir mettre en évidence les deux types de collagène dans les tissus par immunocytochimie en microscopies photonique ou électronique (28).

Les sondes suivantes ont été utilisées :

Collagène type I : Sonde humaine $\alpha 1$ (1) cDNA (Hf404) (29)

Collagène type V : Sonde $\alpha 1$ (V) SmaI fragment de cDNA de souris (30)

Les sondes sont marquées au ^{32}P

Les écailles à 6 jours de régénération utilisées, synthétisent activement la trame collagénique. Les écailles sont fixées par une solution à 4% de formaldéhyde. Les coupes sont effectuées à la congélation avant leur hybridation avec la sonde radioactive. Le temps de contact avec l'émulsion utilisée Ilford K5 a été de 7 jours à 4°C.

Techniques immunocytochimiques pour la mise en évidence du cytosquelette : microtubules et actine

Les marquages immunocytochimiques effectuées sur des écailles isolées normales ou en cours de régénération où la synthèse de collagène est active montrent les relations entre l'orientation du cytosquelette et celle des fibrilles de collagène en contact avec les cellules.

Fixation : Les écailles isolées sont fixées par immersion dans le méthanol froid (-10°C).

Microtubules

Mise en évidence des microtubules par deux anticorps monoclonaux, l'un dirigé contre l'acide aminé terminal de la tubuline qui est la tyrosine, l'autre contre l'acide aminé subterminal la glutamine qui ne peut être mise en évidence que dans la tubuline détyrosinée présente dans des microtubules "stables" (31)

Anticorps primaires :

Anticorps monoclonal YL 1/2 tubuline (acide aminé terminal: tyrosine) pour tous les microtubules.

Anticorps monoclonal 20C6 tubuline détyrosinée (acide aminé terminal A. glutamique) pour les microtubules "stables".

Anticorps secondaires : IgG spécifiques marqués à l' isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou de l'isothiocyante de rhodamine (TRITC)

Actine

1er anticorps : Anticorps monoclonal (Amersham-Buchler)

2ème anticorps : IgG spécifiques marqués à l' isothiocyanate de rhodamine

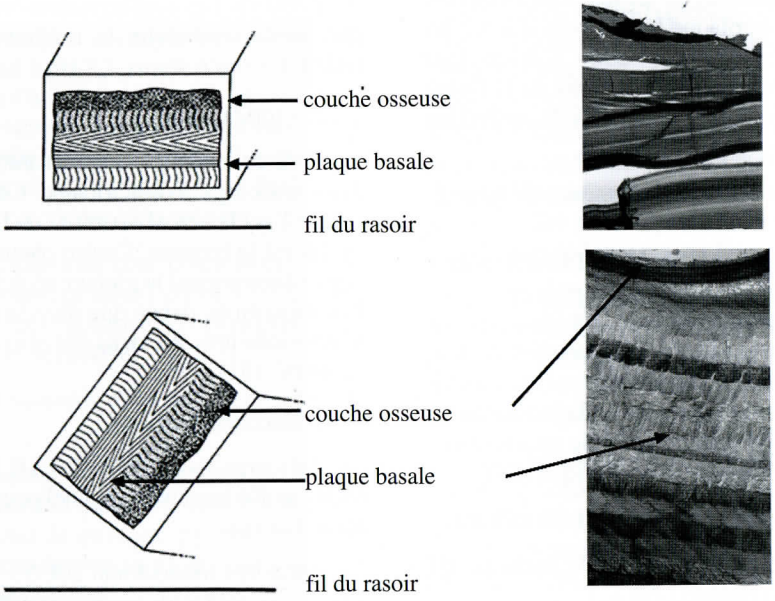


Figure 3. Schéma montrant l'orientation du bloc pour la réalisation des coupes ultrafines.

Montage : Les écailles entières sont montées dans le Mowiol 4.88 (Cabiochem-Hoechst).

Microanalyse de la phase minérale par analyse ionique secondaire (SIMS).

Cette méthode consiste à bombarder la surface de l'échantillon à analyser par un faisceau d'ions (ions primaires) qui provoque l'arrachement d'ions mono ou polyatomiques, les ions secondaires. Ceux-ci collectés et dirigés vers un spectromètre de masse permettent d'établir une carte de répartition de chacun des éléments (32).

Des coupes de 1mm d'épaisseur sont utilisées pour la recherche par l'analyse ionique secondaire des éléments qui constituent les tissus calcifiés notamment le calcium et le phosphore qui sont sous forme d'hydroxyapatite, et ceux qui en plus faible quantité accompagnent l'hydroxyapatite: magnésium, fluor, strontium, et baryum.

RÉSULTATS

Les résultats acquis au moyen des différentes techniques seront exposés pour les différentes parties de l'écaille élasmoïde.

Couche superficielle appelée souvent couche osseuse.

Ornementations de la partie superficielle.

La MEB est une méthode appropriée à l'observation des microreliefs de la surface des écailles. Les micrographies d'écailles cycloïdes montrent les différences des microreliefs sur les crêtes des *ciculi*. Ce sont des petits denticules sur les crêtes des *circuli* d'un gadiforme *Raniceps ranimus* (figures 4a, b) et de petites épines sur les crêtes des *circuli* d'un cyprinidé le carassin (poisson rouge) (figures 5a, b). Les reliefs de la face supérieure des écailles contrôlent l'écoulement de l'eau dans les couches limites et leur confèrent une grande importance fonctionnelle. Les *cteni* dont les détails morphologiques (figures 6a, b) révélés par cette technique peuvent avoir une valeur phylogénétique (23, 33, 34). La morphologie générale des écailles est mise en évidence par l'alizarine utilisée en coloration *in toto*. Cette coloration montre l'absence de minéralisation au niveau des *radii* qui sont des zones plus flexibles de l'écaille (figures 7, 8) surtout vers la partie périphérique où s'accroît l'écaille comme l'indique le marquage par les produits fluorescents injectés successivement (figure 9).

La présence des reliefs de la surface de l'écaille dépend surtout de l'épaisseur de la couche externe (figures 10-13). La couche externe, couche continue, souvent appelée couche osseuse. diffère de la couche la plus superficielle souvent restreinte au champ postérieur de l'écaille: la couche limitante externe par ses caractères histochimiques. Les deux couches contiennent des glycoprotéines APS-positives (figures 11, 13) mais seule la couche limitante externe a des protéoglycanes acides colorées par le bleu alcian (figure 10). Les coupes histologiques montrent que la plaque basale qui forme la partie la plus importante de l'écaille est constituée d'un empilement de strates parallèles à la surface de l'écaille. Elle contient des glycoprotéines légèrement APS-positives (figures 11, 13).

La partie marginale de l'écaille ne comporte que la couche externe entourée par les scléroblastes. Cette partie de l'écaille est insérée dans un repli épidermique (figure 14). Un épaississement local de la couche externe est à l'origine de la formation des crêtes circulaires (figure 15). La couche externe est formée de fines fibrilles de col-

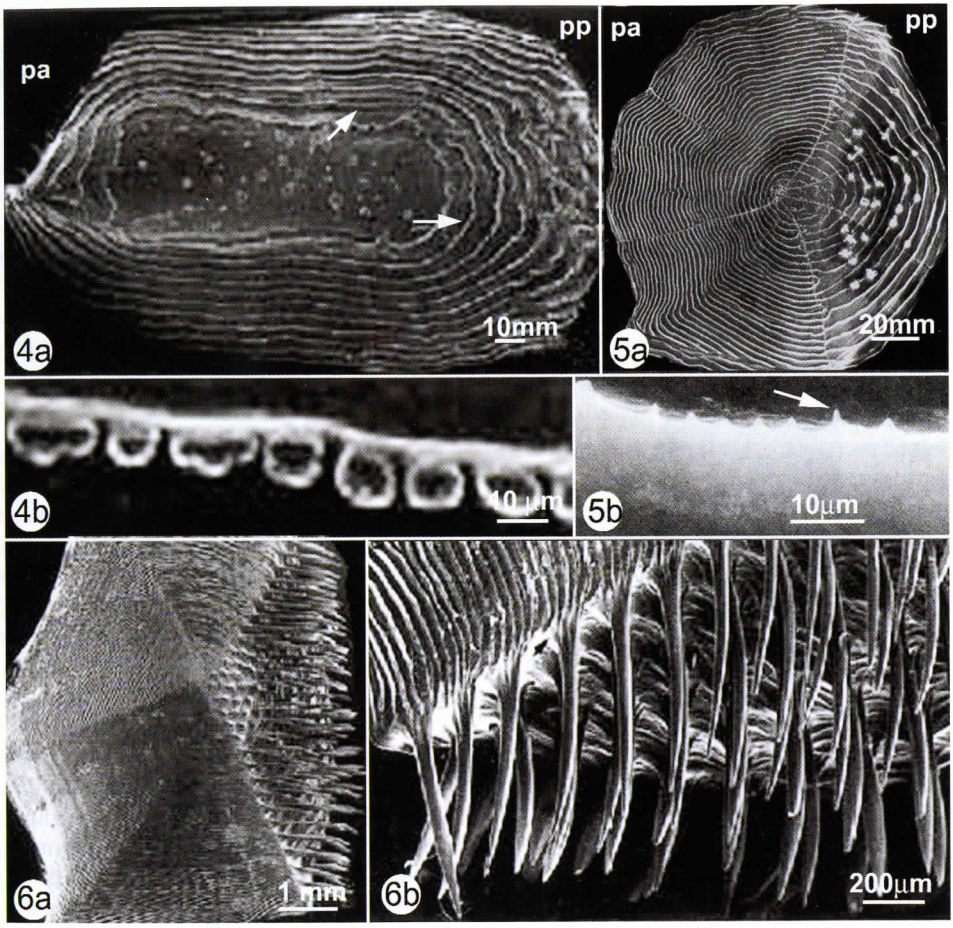


Figure 4. MEB. (a) Surface d'une écaille du gadiforme *Raniceps ranimus* montrant les circuli (flèches). (b) Détail des denticules sur les crêtes.

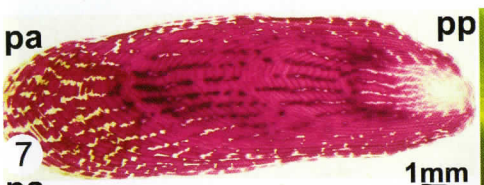
Figure 5. MEB. (a) Surface d'une écaille d'un cyprinidé *Carassius auratus* (carassin ou poisson rouge, Cypriniformes) montrant des circuli dont la forme diffère selon les champs antérieur (pa) ou postérieur (pp). (b) Détail des épines situées sur la crête des circuli du champ antérieur (flèche).

Figure 6. MEB. (a) Surface d'une écaille cténoïde du gadiforme *Coryphaenoides rupestris*. (b) Détail des cteni.

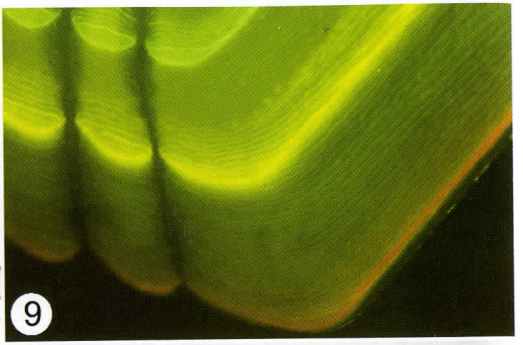
lagène (30nm de diamètre) formant un réseau dans les mailles duquel se déposent les cristaux sans relations avec les fibrilles de collagène (figure 16). La minéralisation s'accroît par agglomération de cristaux qui forment des oursins. Ces derniers s'accolent les uns aux autres pour former une couche de plus en plus minéralisée (figure 17). La couche limitante externe est traversée par des faisceaux de fibrilles de collagène que l'on peut considérer comme des fibres de Sharpey (figure 18). La différence entre les constituants organiques des trois couches de l'écaille apparaît après déminéralisation (figure 19). La couche limitante externe ne contient pas de fibrilles de collagène à l'exception des faisceaux d'ancrage qui la traversent (35). La couche externe contient un réseau de fibrilles de collagène de 30 nm de diamètre et enfin la plaque basale est constituée de fibrilles de plus fort calibre (environ 100nm). L'organisation spatiale des fibrilles de collagène de la plaque basale, en strates superposées dans lesquelles les fibrilles sont parallèles les unes aux autres et l'orientation des fibrilles varie d'une strate à la suivante, correspond à la définition d'un contreplaqué biologique (36). La mesure de l'angle de rotation est effectuée soit sur des lames minces observées au microscope à lumière polarisée (figures 20a, b) soit sur des micrographies de cassures obliques de la plaque basale observées au microscope à balayage (figure 21). La mesure des angles de rotation détermine le type de contreplaqué biologique qui, lorsque l'angle de rotation entre deux strates adjacentes est de 90°, est appelé orthogonal ou torsadé dans les autres cas. Des contreplaqués plus complexes sont constitués deux systèmes emboîtés, les angles de rotation sont constants entre les strates paires d'une part et entre les strates impaires d'autre part et non plus entre les strates adjacentes. Des faisceaux perpendiculaires aux strates appelés fibres TC (38) constituées de fibrilles de collagène sont présentes chez des espèces dans différentes familles comme celle des cyprinidés (figure 22).

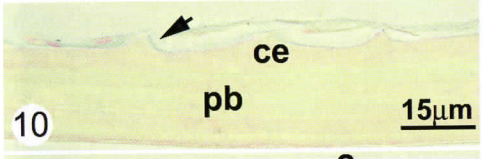
La minéralisation de la plaque basale se produit après et à partir de la couche externe. Les cristaux de la couche externe induiraient la formation de nouveaux cristaux au niveau des fibrilles de collagène de la strate de la plaque basale adjacente à la couche externe. Cette minéralisation appelée "subséquente" (15, 37), progresse depuis la couche externe vers la partie profonde de la plaque basale. L'aspect du front de minéralisation varie en fonction de l'organisation spatiale de la plaque basale. La minéralisation peut progresser de façon uniforme dans les différentes strates (figure 23). La présence des fibres "TC" dont la minéralisation précède celle des fibrilles du contreplaqué donne un aspect particulier (figure 24) à ce front de minéralisation (38, 16).

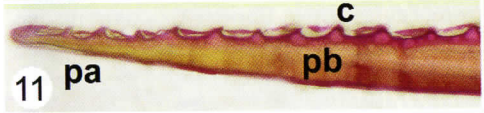
Le dépôt des cristaux de minéral est orienté par les fibrilles de collagène (figure 25) : minéralisation inotropique comme dans un tissu osseux. La mise en oeuvre des cryotechniques qui conservent mieux la phase minérale que la fixation chimique aqueuse met en évidence des différences avec le tissu osseux. Dans la plaque basale, les cristaux envahissent la matrice interfibrillaire, entourent les fibrilles de collagène, cependant, ne pénètrent que peu profondément dans les fibrilles (figure 25). Le centre des fibrilles est clair aux électrons contrairement au tissu osseux où les fibrilles sont envahies par le minéral (figure 26). La taille de la zone claire correspond à la taille des fibrilles observées dans une zone non minéralisée (figures 27, 28). La particularité du front de minéralisation de la plaque basale des téléostéens réside en la présence

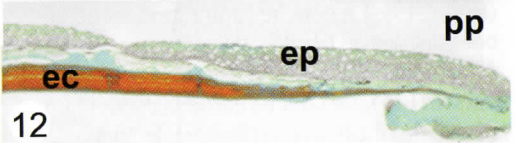

pa
pp
7
1mm

pa
pp
8
1mm

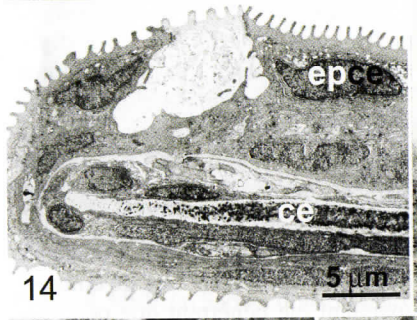

9

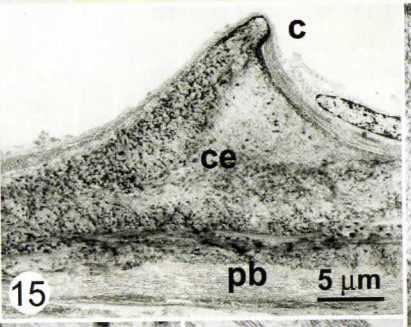

ce
pb
10
15µm


c
pb
pa
11

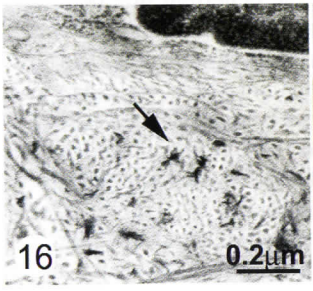

pp
ep
ec
12

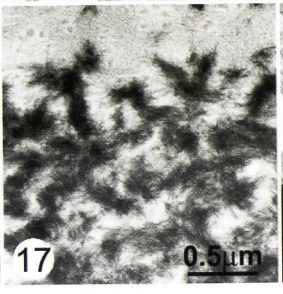
13


epce
ce
14
5 µm


c
ce
pb
15
5 µm

le
ce
pb
19
1 µm


16
0.2µm


17
0.5µm

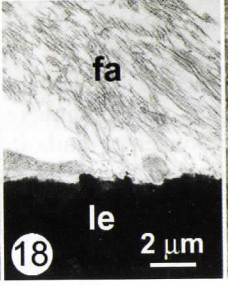

fa
le
18
2 µm

Figure 7. Ecaille cycloïde d'un lieu jaune *Pollachius pollachius* (Gadiformes) colorée *in toto* par l'alizarine montrant des zones non colorées dans les radii. pa : partie antérieure ; pp : partie postérieure.

Figure 8. Ecaille cténoïde de la face pigmentée d'une sole *Solea solea* (Pleuronectiformes) colorée *in toto* par l'alizarine.

Figure 9. Microscopie optique U.V. Utilisation trois fluorochromes pour mettre en évidence la croissance d'une écaille. La croissance s'effectue dans la partie marginale de l'écaille: depuis la marque la plus centrale fluorescence jaune-vert (tétracycline) à la plus périphérique fluorescence rouge (alizarine) en passant par la fluorescence jaune (fluorescéine) intermédiaire. La distance entre deux marques correspond à la croissance de l'écaille pendant le temps séparant l'administration de deux marqueurs successifs. (Cliché F.J. Meunier)

Figures 10-13. Coupes perpendiculaires à la surface d'écailles de carpe *Cyprinus carpio* (Cypriniformes).

Figure 10. Bleu alcian-rouge nucléaire solide. Partie centrale de l'écaille. Seule la fine couche limitante externe est colorée par le bleu alcian. ce : couche externe ; pb : plaque basale

Figure 11. Hématoxyline de Groat-APS. Partie antérieure (pa) d'une écaille où la couche externe est plus réactive à l'APS que la plaque basale.

Figure 12. Trichrome en un temps. Partie postérieure de l'écaille (pp). La couche externe (ce) est colorée en vert alors que la plaque basale (pb) est colorée en rouge.

Figure 13. Hématoxyline de Groat-APS. Partie postérieure (pp). Seule la couche externe est colorée par l'APS. Les mucocytes de l'épiderme (ep) sont également APS-positifs.

Figures 14-19. MET. Coupes perpendiculaires à la surface de l'écaille au niveau du champ antérieur.

Figure 14. Cryofixation-cryosubstition. Coupe perpendiculaire à la surface de l'écaille au pôle antérieur de l'écaille d'un guppy, *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes). Les scléroblastes entourent la couche externe (ce) seule couche présente à la périphérie de l'écaille. ep : épiderme

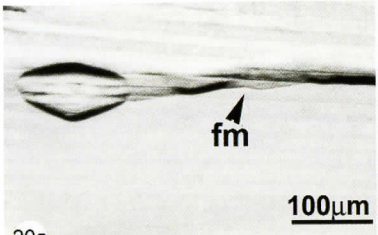
Figure 15. Coupe perpendiculaire à la surface de l'écaille au niveau de la formation du premier circulus (c) dû à une augmentation de taille de la couche externe (ce) pb : plaque basale.

Figure 16. Ecaille de carassin. Cryofixation-cryosubstitution. Détail du dépôt des premiers cristaux (flèche) sans ordre apparent sur la trame formée par un enchevêtrement de fines fibrilles de collagène.

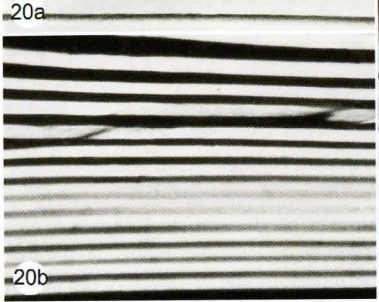
Figure 17. Ecaille de carassin. Cryofixation-cryosubstitution. Agglomération des cristaux dans la couche externe.

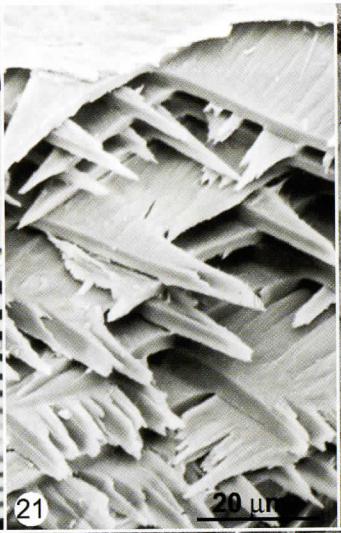
Figure 18. Ecaille de carassin. Couche limitante externe (le) bien minéralisée traversée par un faisceau de fibres d'ancrage (fa).

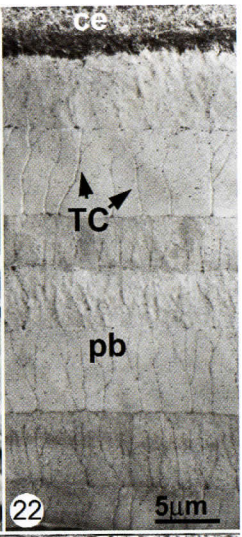
Figure 19. Coupe déminéralisée concernant les trois couches formant l'écaille élasmoïde dans une écaille de carassin. ce : couche externe ; le : couche limitante externe ; pb : plaque basale.

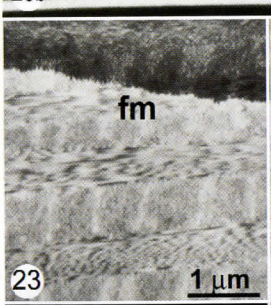

fm
100μm

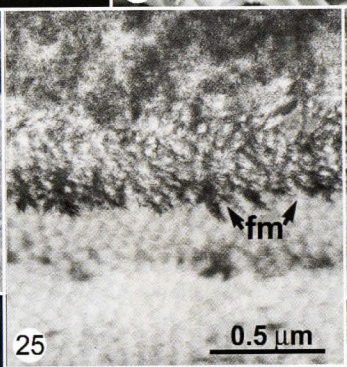
20a

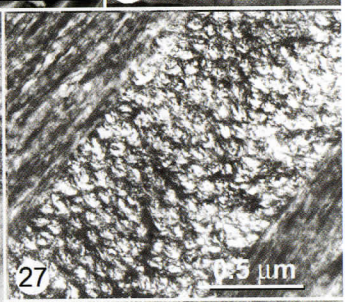

20b

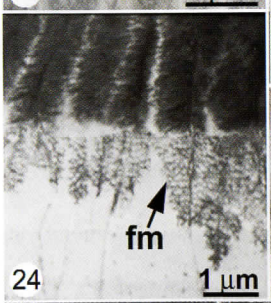

21
20 μm

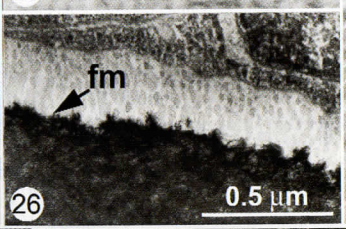

ce
TC
pb
22
5μm

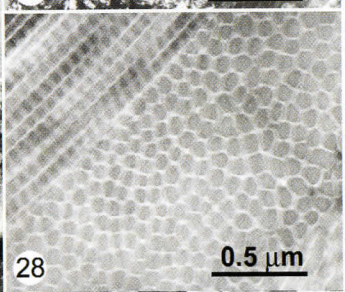

fm
23
1 μm

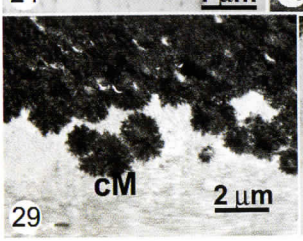

fm
25
0.5 μm

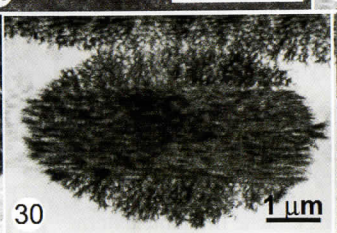

27
0.5 μm


fm
24
1 μm


fm
26
0.5 μm


28
0.5 μm


cM
2 μm
29


30
1 μm

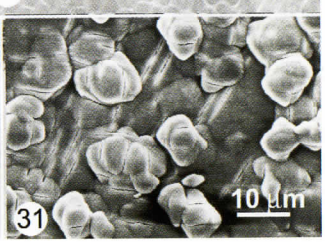

31
10 μm

Figure 20. Lame mince d'écaille d'*Etelis carbunculus* (Perciformes) (a), au microscope à lumière naturelle fm : front de minéralisation (b), au microscope à lumière polarisée où l'alternance de bandes claire et sombre est due à l'alternance des directions des fibrilles de collagène d'une strate à l'autre. (Clichés F.J. Meunier).

Figure 21. MEB. Ecaille de *Macrourus berglax* (Gadiformes) dont la fracture traverse les strates de la plaque basale laissant voir l'orientation des fibrilles des différentes strates.

Figure 22. MET. Coupe perpendiculaire à la surface de l'écaille du carassin montrant la superposition des strates de fibrilles de la plaque basale ce : couche externe ; pb : plaque basale ; TC : fibres de collagène TC perpendiculaires aux strates.

Figure 23. MET. Coupe perpendiculaire à la surface de l'écaille de *Macrourus berglax* où le front de minéralisation forme une ligne régulière.

Figure 24. MET. Coupe perpendiculaire à la surface de l'écaille du carassin. La minéralisation débute au niveau des fibrilles TC formant un front minéralisation en forme de sapin inversé.

Figure 25. MET. Cryofixation-cryosubstitution. Détail du front de minéralisation (fm) dans une écaille de guppy. Les cristaux envahissent les espaces interfibrillaires.

Figure 26. MET. Cryofixation-cryosubstitution. Détail du front de minéralisation dans une vertèbre de guppy. Les fibrilles de collagène et les espaces interfibrillaires sont envahis par les cristaux.

Figure 27. MET. Cryofixation-cryosubstitution. Coupe au centre de la plaque basale dans une strate minéralisée d'écaille de carassin montrant l'espace clair correspondant au centre des fibrilles de collagène dépourvu de cristaux.

Figure 28. MET. Cryofixation-cryosubstitution. Même zone que celle de la figure 27 mais dans la partie non minéralisée de la plaque basale. Le diamètre des fibrilles coupées transversalement correspond au diamètre des espaces clairs au centre des fibrilles dans les zones minéralisées.

Figure 29. MET. Front de minéralisation dans la partie profonde de la plaque basale d'une écaille de guppy. Des granules minéralisés, les corpuscules de Mandl (cM), se trouvent en avant du front de minéralisation.

Figure 30. MET. Ecaille d'un tacaud *Trisopterus luscus* (Gadiformes). Détail d'un corpuscule de Mandl montrant que les cristaux peuvent envahir plusieurs strates. Dans chaque strate, le grand axe des cristaux est parallèle à celui des fibrilles de collagène.

Figure 31. MEB. Corpuscules de Mandl à la surface du front de minéralisation d'une écaille du tacaud.

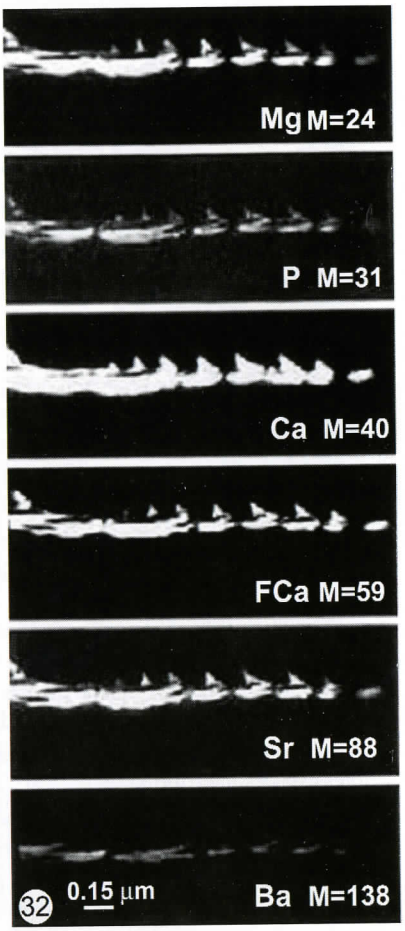


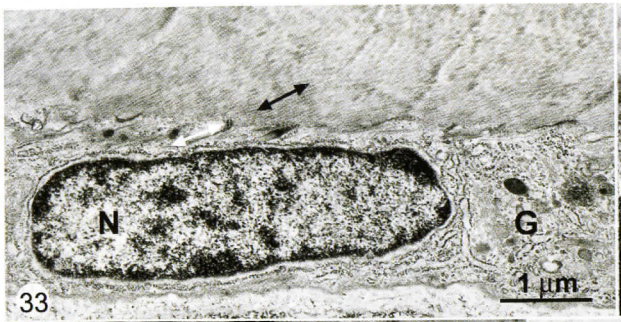
Figure 32. Eléments minéraux identifiés par émission ionique secondaire. Coupe d'écaille de tacaud.

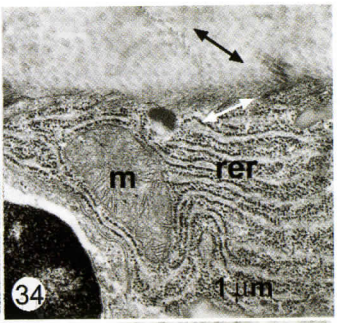
de corpuscules minéralisés en avant de ce front, les corpuscules de Mandl (figures 29-31). Leur minéralisation est de type inotropique. Les cristaux changeant d'orientation d'une strate à l'autre en fonction de celle des fibrilles de collagène sousjacentes (figure 30) confèrent aux corpuscules de Mandl, leur aspect particulier lorsqu'ils sont observés en MEB (figure 31).

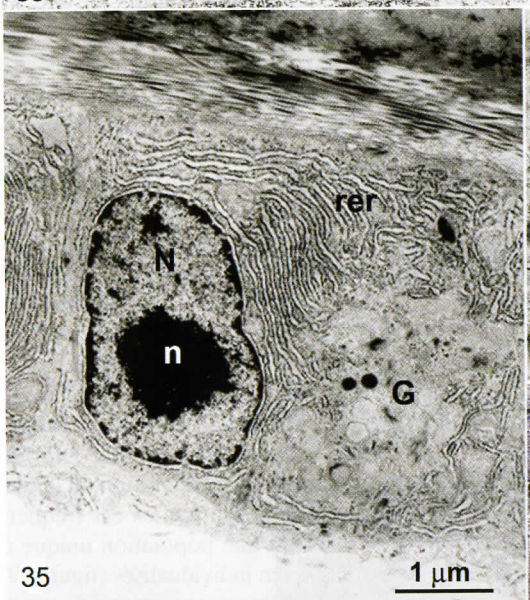
La phase minérale de la plaque basale et des couches plus superficielles limitante externe et couche externe est une hydroxyapatite à laquelle sont associés des éléments minéraux comme dans le tissu osseux. L'analyse ionique secondaire montre les éléments minéraux associés au calcium (figure 32) comme dans le tissu osseux (39, 40).

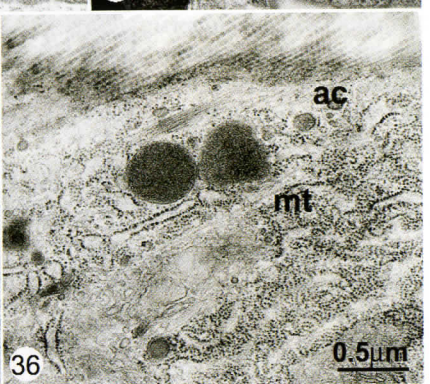
Les scléroblastes qui forment la plaque basale étroitement unies forment un pseudo-épithélium continu bordant la face profonde de la plaque basale dans les écailles normales et régénérées (figures 33-36). Des jonctions filtrantes assurent la transmission de signaux entre ces cellules (37). Les scléroblastes basaux synthétisent des fibrilles de collagène d'environ 100nm de diamètre qui dès leur sortie dans l'espace extracellulaire sont orientées en parallèle et le demeurent à l'intérieur chaque strate constituant le contreplaqué de la plaque basale (figures 23, 28). Les scléroblastes des écailles normales sont des cellules aplaties de faible épaisseur (figure 33) par contre les scléroblastes d'écailles en régénération de hautes cellules prismatiques (figure 34) où la présence d'aires golgiennes et de RER très développés témoignent de leur activité de synthèse (figures 35, 36), environ une strate par jour pendant les 4 premiers jours de régénération (Sire et Géraudie, 1984). Les fibrilles de collagène en relation avec la membrane plasmique sont alignées dans la même direction que les filaments d'actine et les microtubules (41) situés sous la membrane plasmique (figures 33, 36). Pour conserver l'alignement fibrilles de collagène - cytosquelette (filaments d'actine et microtubules) pendant les premiers stades de régénération où les changements d'orientation des fibrilles de collagène sont fréquents, les filaments d'actine et les microtubules doivent subir d'aussi fréquents réarrangements (42). L'utilisation de deux anti-corps spécifiques permet de mettre en évidence des populations de microtubules à durées de vie différentes. Dans les scléroblastes de faible épaisseur des écailles normales (figure 38) dont la synthèse de collagène est peu active, où les changements d'orientation des fibrilles sont moins fréquents, deux populations de microtubules ont été identifiées. L'une est composée de Tyr-Mts (figure 38b). L'autre contient des microtubules dont la tubuline est détyrosinée : l'acide aminé terminal devenant l'acide glutamique (Glu-Mts) (figure 38c). Ces derniers doivent avoir une durée de vie suffisante pour que se produise la détyrosination (43, 44). Les scléroblastes de haute taille (figure 39a) des écailles en cours de régénération où le réarrangement des microtubules est fréquent, ne possèdent qu'une population unique de microtubules bien individualisés (figure 39b, c) dont la tubuline a comme acide aminé terminal la tyrosine (Tyr-Mts).Il n'y a pas de microtubules individualisés révélés par l'anticorps dirigé contre les glu-Mts. Le cytosquelette notamment les microtubules semblent donc impliquée dans l'organisation spatiale des fibrilles de collagène formant les structures en contreplaqués de la plaque basale des écailles (45).

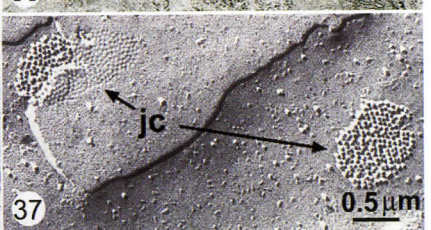
La transparence des écailles dépend de l'organisation spatiale de la plaque basale, principale couche des écailles élasmoïdes qui présente de grandes similitudes avec celle de la cornée dont la transparence est

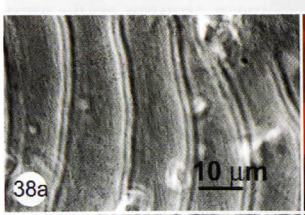

N
G
1 µm
33


m
rer
34
1 µm

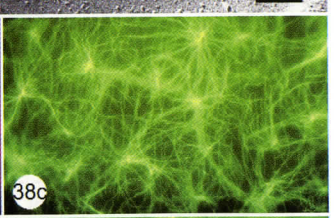

rer
N
n
G
35
1 µm

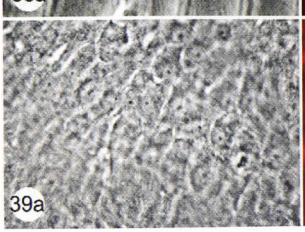

ac
mt
36
0.5µm


jc
37
0.5 µm


10 µm
38a

38b


38c


39a

39b

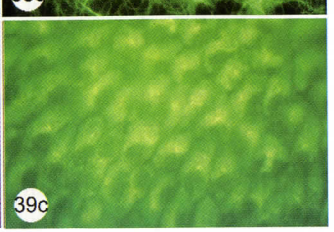

39c

Figure 33. MET. Scléroblastes à la base de la plaque basale d'une écaille de carassin. Les microtubules (flèche blanche) et des fibrilles de collagène à proximité de la cellule (flèche noire) sont orientés en parallèles.

Figure 34. MET. Détail d'un scléroblaste de la base de l'écaille de carassin. Les microtubules (flèche blanche) et les fibrilles de collagène (flèche noire) sont perpendiculaires.

Figure 35. MET. Scléroblaste de la base d'une écaille régénérée de carassin. Ces cellules à forte activité synthétique montrent des aires golgiennes développés (G) un abondant réticulum endoplasmique rugueux (rer). N: noyau; n: nucléole

Figure 36. MET. Détail de scléroblaste d'écaille régénérée de carassin montrant, au pôle apical, des microtubules (mt) et des filaments d'actine (ac) orientés dans la même direction que les fibrilles de collagène.

Figure 37. MET. Cryofracture. Les scléroblastes de la partie basale sont unis par des jonctions (jc) de type communicant (gap junctions).

Figure 38. Ecaille normale de carassin. Immunomarquage des microtubules de scléroblastes basaux. (a) Vue de l'écaille en contraste de phase, (b) Marquage par les anticorps YL1/2 + isothiocyanate de rhodamine de la tubuline avec la tyrosine comme acide aminé terminal, (c) Marquage par les anticorps 20C6 + isothianate de fluorescéine de la tubuline détyrosinée.

Figure 39. Ecaille régénérée (4 jours) de carassin. Même immunomarquage que figure 37 des scléroblastes basaux, (a) Contraste de phase, (b) Anticorps YL1/2 + isothiocyanate de rhodamine, (c) Anticorps 20C6 + isothianate de fluorescéine.

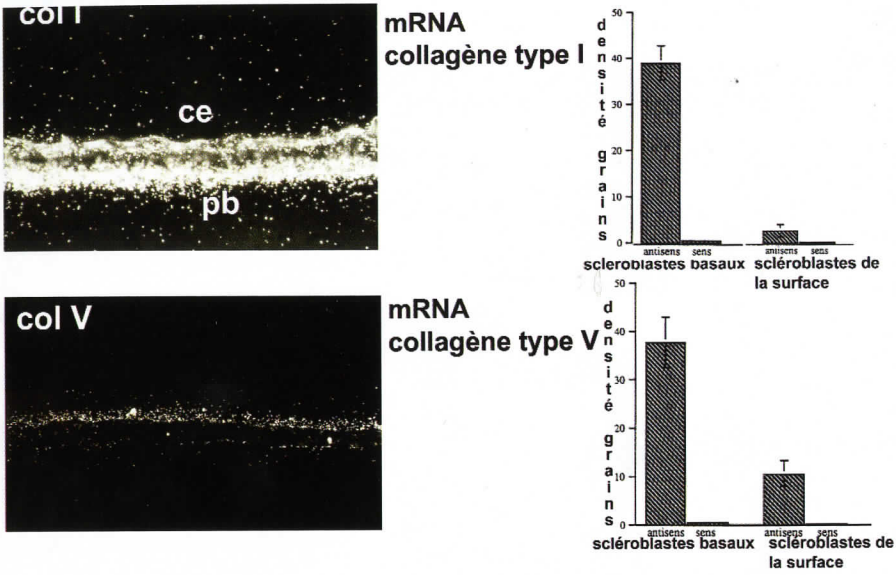


Figure 40. Hybridation in situ. Mise en évidence des mRNA des collagènes fibrillaires de type I et de type V dans les scléroblastes des écailles de carassin.

attribuée aux caractéristiques du stroma collagénique, la régularité de la taille des fibrilles comme leur organisation spatiale sont les éléments primordiaux conférant à la cornée sa transparence (46). De même que dans la cornée (47), les fibrilles de collagène des écailles, sont des fibrilles hétérotypiques où le composant majeur est le collagène de type I auquel est associé le collagène de type V (48, 28). Dans la cornée, le collagène de type V, bien que minoritaire, a néanmoins un rôle essentiel non seulement dans le contrôle du calibre des fibrilles hétérotypiques (49, 50, 51) mais aussi dans la formation des fibrilles (52). Le diamètre des fibrilles de collagène des écailles élasmoïdes serait contrôlé par le collagène de type V comme dans la cornée où plus les fibrilles sont fines, plus leur teneur en collagène de typeV est élevée (49). Tous les scléroblastes de l'écaille produisent les deux types de collagène; les mARN messagers du type V semblent plus abondants dans les scléroblastes produisant les fibrilles les plus fines. (48, 28).

Les similitudes entre les écailles et la cornée sont à la base de recherches où les écailles élasmoïdes notamment les écailles régénérées sont utilisées pour produire un stroma collagénique considéré comme un biomatériel de substitution de cornée (53).

Remerciements

Le Professeur F.J. Meunier (MNHN, Paris) a eu la gentillesse de me fournir des micrographies pour illustrer ce document. Je l'en remercie très sincèrement. Les micrographies de microscopies électroniques à balayage et à transmission ont été effectuées au Centre de Microscopie électronique, Institut Biologie Intégrative (IFR83) Université Pierre et Marie Curie, Paris.

BIBLIOGRAPHIE

1. BELON DU MANS P. Histoire naturelle des étranges poissons marins. 1551.
2. BELON DU MANS P. La nature et la diversité des poissons, avec leurs pourtraicts. 1555.
3. AGASSIZ L. Recherches sur les poissons fossiles, Neufchatel. 1833-1844. **1**, 69-90.
4. BAUDELOT M.M. Recherches sur la structure et le développement des écailles des poissons osseux. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 1873, **2**, 87-244 et 429-480.
5. KLAATSCH H. Zur Morphologie der Fischschuppen und zur Geschichte der Hartsubstanzgewebe. *Gegenbaurs morphol. Jahrb.*, 1890, **16**, 209-258.
6. BURDAK V.D. Morphologie fonctionnelle du tégument écailleux des poissons. (Traduit du Russe, 1979). *Cybium*, 1986, 10 (Suppl. 3) 1-147.
7. BERTIN L. Modifications proposées dans la nomenclature des écailles et des nageoires. *Bull. Soc. Zool. France*, 1944, **69**, 198-202.
8. HOFFBAUER A.E. Die Alterobestimmung des Karpfen am seiner Schuppen. *Allgemein Fisherei Zeigt. Jahrg.* 1898, **23**, 341-343.
9. OMBREDANE D., BALINIÈRE J.L. Les écailles et leur utilisation en écologie halieutique. In : Tissus durs et âge individuel des Vertébrés. Colloque National Bondy. J.L. Baglinière, J. Castanet, F. Conand, F.J. Meunier eds. 151-192. ORSTOM et INRA, Paris, 1991.
10. THOROGOOD P., WOOD A.T. Analysis in vivo of cell movement using transparent tissue system. *J. Cell Sci.*, 1987, **8**, 395-413.
11. NEAVE F. On the histology and regeneration of the teleost scale. *Quart. J Microsc. Sci.*, 1940, **81**, 541-568.
12. SIRE J.Y., GÉRAUDIE J. Fine structure of the developing scale in the Cichlid *Hemichromis bimaculatus* (Pisces, Teleostei, Perciformes) *Acta Zool.*, 1983, **64**, 1-8.
13. SIRE J.Y., GÉRAUDIE J. Fine structure of regenerating scales and their associated cells in the Cichlid *Hemichromis bimaculatus* (Gill) *Cell Tissue Res.*, 1984, **237**, 537-547.
14. BEREITER-HAHN J., ZYLBERBERG L. Regeneration of teleost fish scale. *Comp. Biochem. Physio.*, 1991, **105A**, 6625-641.
15. SCHÖNBÖRNER A.A., BOIVIN G., BAUD C.A. The mineralization process in teleost fish scales. *Cell Tissue Res.*, 1979, **202**, 203-212.

16. ZYLBERBERG L., NICOLAS G. Ultrastructure of scales in a teleost *(Carassius auratus* L.) after use of rapid freeze-fixation and freeze-substitution. *Cell Tissue Res.,* 1982, **223**, 349-367.

17. BOIVIN G., MEUNIER F.J. Bone formation and and fluorescent labelling in teleost fishes. In: Symposium de recherches sur les tissus calcifiés des poissons. CNEXO-COB, Brest, 1978.

18. MEUNIER F.J., BOIVIN G. Action de la fluorescéine, de l'alizarine, du bleu de calcéine et de diverses doses de tétracyclines sur la croissance de la truite et de la carpe. *Ann. Biol. Animale Bioch. Biophys.* 1978, **18**, 1293-1308.

19. TANING A.V. Experiments on meristic and other characters in fishes. *Medd. Komm. Danmarks Fisk.-og Havunders (Serie Fiskeri),* 1944, **11**, 1-66.

20. MAEKAWA K, YAMADA J. Some histochemical and fine structural aspects of growing scales of the rainbow trout. *Bul. Faculty Fisheries, Hokkaido Univer.,* 1970, **21**, 70-78.

21. GABE M. Techniques histologiques. Masson, Paris, 1968.

22. LANZING W.J.R., HIGGINBOTHAM D.R. Scanning microscopy of surface structure of Tilapia mossambica (Peters). *J. Fish Biol.,* 1974, **6**, 307-310.

23. HUGHES D.R. Development and organization of the posterior field of ctenoid scales in the Platycephalidae. *Copeia,* 1981, **3**, 596-606.

24. HUNZINGER E.B., HERMANN W. *In situ* localization of extracellularmatrix components by electron microscopy after cryotechnical tissue processing. *J. Histochem. Cytochem.,* 1987, **35**, 647-655.

25. NICOLAS G. Advantages of fast-freeze-fixation followed by freeze-substitution for the preservation of cell integrity. *J. Electr. Microsc. Technol.,* 1991, **18**, 395-405.

26. RAISON D. La cryofracture:une technique alternative et complémentairement la microscopie électronique à transmission. *Rev. Franç. Histotechnol.,* 2008, **21**, 75-86.

27. ALLIZARD F., ZYLBERBERG L. A technical improvement for sectioning hard laminated fibrous tissues for electron microscopic studies. *Stain Technol.* 1982, **57**, 335-339.

28. LE GUELLEC D., ZYLBERBERG L. Expression of type I and type V collagen mRNAs in the elasmoid scales of a teleost fish as revealed by in situ hybridization. *Connective Tissue Res.,* 1998, **39**, 257-267.

29. CHU M.L., MYERS J.C., BERNARD M.P., DING J.F., RAMIREZ F. Cloning and characterization of five overlapping cDNA specific for the human pro-α1 (I) collagen chain. *Nuclear acid Res.,* 1982, **10**, 5925-5934.

30. MATTEI G., BRUCE B., KARSENTY G. Mouse a1 type V collagen gene maps to the A2-B) region of chromosome 2. *Genomics,* 1993, 16, 786-788.

31. WEHLAND J., WILLI NGHAM M.C; SANDOVAL I.V. A rat monoclonal antibody reacting specifically with tyrosinated form of α tubulin. *J. Cell Biol.,* 1983, **9**, 1467-1475.

32. CASTAING R. SLOZIAN G. Microanalyse par émission ionique secondaire. *J. Microsc.* (Paris), 1962, **1**, 395-410.

33. IWAMOTO T. Phylogeny of Grenadiers (Suborder Macrouroidei) : another interpretation. *In :* Papers on the systematic of Gadiform Fishes (D.M. Cohen ed.), 1989, **32**, 159-175.

34. KHEMIRI S., MEUNIER F.J., LAURIN M., ZYLBERBERG L. Morphology of the scales in the Gadiformes (Actinopterigyans, teleostei, Paracantopterygii). *Cahier de Biol. Marine.,* 2001, **42**, 345-362.

35. ZYLBERBERG L., MEUNIER F.J. Evidence of denticles and attachment fibres in the superficial layer of scales in two fishes: *Carassius auratus and Cyprinus carpio* (Cyprinidae, Teleostei). *J. Zool.* (London), 1981, **195**, 459-471.

36. GIRAUD M.M., CASTANET J., MEUNIER F.J. BOULIGAND Y. The fibrous structure of coelacanth scales : a twisted "plywood". *Tissue Cell,* 1978, **10**, 671-686.

37. OHIRA Y., SHIMIZU M., URA K., TAGAKI Y. Scale regeneration and calcification in goldfish *Carassius auratus :* quantitative and morphological processes. *Fisheries Sci.,* 2007, **73**, 46-54.

38. ONOZATO H. WATABE N. Studies on the fish scales formation and resorption III Fine structure and calcification of the fibrillary plate of the scales in Carassiius auratus (Cypriniformes, Cyprinidae). *Cell Tissue Res.,* 1979, **201**, 409-422.

39. HANCOX N.M. Basic components of bone matrix. In: Biology of bone. 36-49. Cambridge University Press, 1972.

40. POZNER A.S. Bone mineral and mineralization process. In : *Bone mineral Res.,* 1987, **5**, 65-116. W.A.Pieck (ed.) Elsevier, Amsterdam.

41. DANE P.J, TUCKER J.B. Supra cellular microtubule alignments in cell layers associated with secretion of certain fish scales. *J. Cell Sci.,* 1986, Suppl. **5**, 273-291.

42. ZYLBERBERG L, BEREITER-HAHN J., SIRE J.Y. Cytoskeletal organization and collagen orientation in the fish scales. *Cell Tissue Res.,* 1988, **253**, 597-607.

43. GUNDERSEN G.G., BULINSKI J.C. Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-transitionally modified form of tubulin. *Europ. J. Cell Biol.,* 1986, **42**, 288-294.

44. SCHULZE E., KIRSCHNER M.W. Dynamic and stable populations of microtubules in cells. *J. Cell Biol.,* 1987, **104**, 277-288.

45. ZYLBERBERG L., BEREITER-HAHN J. The distribution of Tyr- and Glu-microtubules during fish scale regeneration. *Eur. J. Cell Biol.,* 1991, **54**, 132-139.

46. MAURICE D.M. The structure and transparency of the corneal stroma. *J. Physiol.,* 1957, **136**, 263-286.

47. BIRK D.E., FITCH J.M., BABIARZ J.P., LISENMAYER T.F. Collagen type I and type V are present in the same fibril in avail corneal stroma. *J. Cell Biol.,* 1988, **106**, 999-1008.

48. ZYLBERBERG L, BONAVENTURE J., COHEN-SOLAL L., HARTMANN D.J. & J. BEREITER-HAHN. Organization and characterization of fibrillar collagen in fish scales *in situ* and *in vitro. J. Cell Sci.,* 1992, **103**, 273-285.

49. BIRK D.E., FITCH J.M., BABIARZ J.P., DOANE K.J., LISENMAYER T.F. Collagen fibrillogensis in vitro: Interaction of type I and V collagen regulates fibril diameter. *J. Cell Sci.,* 1990, **95**, 649-657.

50. LISENMAYER T.F, FITCH J.M., BIRK D.E. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens: controlling elements in corneal morphogenesis. *Ann. N Y. Acad. Sci,* 1990, **580**, 143-160.

51. BIRK D.E. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the in the regulation of fibril assembly. *Micron* 2001, **32**, 223-237.

52. WENSTRUP R.J., FLORER J.B., BRUNSKILL E.E., BELL S.M., CHERVONEVAI., BIRK D.E. Type v collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J. Biol. Chem.,* **279**, 53331-53337.

53. TAKAGI Y., URA K. Teleost fish scales: a unique biological model for fabrication of materials for corneal stroma regeneration. *J. Nanosci. Nanotechnol.,* **7**, 757-762.