



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Comptes Rendus Biologies

www.sciencedirect.com



Biologie cellulaire/Cell biology

Aspects cellulaires du vieillissement de la glande pinéale chez la musaraigne, *Crocidura russula**Cellular aspects of aging in the pineal gland of the shrew, Crocidura russula*Aicha Dekar-Madoui ^{a,*}, Laurence Besseau ^{b,c}, Élodie Magnanou ^{b,c}, Roger Fons ^b, Saliha Ouali ^a, Mounira Bendjelloul ^a, Jack Falcon ^{b,c}^a Équipe neurobiologie, laboratoire de biologie et physiologie des organismes, faculté des sciences biologiques, université des sciences et de la technologie Houari-Boumediene, Alger, Algérie^b CNRS, UMR 7232 BIOM, avenue Fontaulé, 66650 Banyuls-sur-Mer, France^c Laboratoire Aragó, université Pierre-et-Marie-Curie Paris 6, avenue Fontaulé, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

I N F O A R T I C L E

Historique de l'article :

Reçu le 29 août 2011

Accepté après révision le 14 novembre 2011

Mots clés :

Glande pinéale

Sénescence

Ultrastructure

Musaraigne musette

Keywords:

Pineal gland

Aging

Ultrastructure

Shrew

R É S U M É

La musaraigne musette *Crocidura russula* a une durée de vie courte et la phase de sénescence est considérablement allongée en captivité. La perte de rythmicité des fonctions biologiques qui accompagne ce vieillissement est, par ailleurs, bien documentée. *C. russula* constitue ainsi un excellent modèle pour tester les conséquences de la sénescence sur les horloges biologiques. La mélatonine est une hormone clef dans la synchronisation des comportements, métabolismes et régulations physiologiques avec les facteurs du milieu. Dans ce travail, nous avons cherché à savoir si la perte de la rythmicité circadienne et, en particulier, celle de la sécrétion de mélatonine (MLT) observées dès la deuxième année de vie chez cette espèce pouvaient être associées à des modifications de structure du parenchyme pinéal, lieu de synthèse de l'hormone. Des pinéales d'individus jeunes (1–4 mois) et sénescents (25–28 mois) ont été analysées au microscope électronique à transmission (MET). Dans les pinéaloctes de musaraignes âgées, les altérations touchent le noyau, les mitochondries et les citernes de réticulum avec un accroissement du nombre de corps denses et la formation de corps concrétiques. Les produits de sécrétion se raréfient. Ces modifications évoquent un ralentissement du métabolisme pinéaloctaire, ce qui expliquerait la réduction des taux de MLT enregistrés chez l'espèce au cours de l'âge.

© 2011 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

A B S T R A C T

The Greater White-toothed shrew *Crocidura russula* is short-lived species and the phase of senescence is greatly elongated in captivity. The loss of rhythmicity of biological functions that accompanies its aging is also well documented. *C. russula* is thus an excellent model to test the effects of aging on biological clocks. Melatonin is a key hormone in the synchronization of behaviors, metabolisms and physiological regulations with environmental factors. In the present work we want to know if the loss of rhythmicity and the reduced melatonin levels registered by the second year of life in this species could be associated to modified ultrastructural features of the pineal parenchyma, site of melatonin synthesis. Transmission electron microscopy (TEM) analysis of young (1–4 months) and

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : aicha.dekar@gmail.com (A. Dekar-Madoui).

old (25–28 months) shrew's pineals show that in older individuals, the parenchyma undergoes alterations affecting mainly nucleus, mitochondria and endoplasmic reticulum cisternae, with increased numbers of dense bodies and the formation of many concretions as well as a depletion of secretory products. These changes suggest a process of slowing pinealocytes metabolism which could explain the gradual reduction of melatonin levels registered during aging in *C. russula*.

© 2011 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Abridged English version

The functional integrity of living organisms depends on their ability to maintain their internal variables synchronized to environmental factors. In mammals, this property is under the control of interconnected neural structures, where the pineal gland constitutes the last relay. This gland responds to the alternating 24 h light/dark cycles by the release of melatonin hormone at night. Numerous studies show a loss of circadian rhythmicity in aging organisms. Correspondingly, pineal melatonin secretion is gradually declined.

The Greater White-toothed shrew *Crocidura russula* appears as an ideal study model to test the effects of aging on biological clocks; its lifespan is short and is substantially increased in captivity; its daily and seasonal rhythms, while very marked the first year of life, are dramatically altered during the senescence process which starts during the second year. In the present work, we want to know if the loss of rhythmicity and the reduced melatonin levels registered by the second year of life in this species could be associated to modified ultrastructural features of the pineal parenchyma, site of melatonin synthesis. Nine shrews from livestock (photoperiod: 12L/12D; temperature 22 ± 2 °C) were used. Pineals from three young (1–4 months) and three senescent (25–28 months) individuals were collected and studied by transmission electron microscopy analysis. Three whole brains were fixed in Bouin fluid and embedded in paraffin to study the topographic progress of the gland on frontal serial sections.

Anatomically, the pineal tissue is present in a single cone shaped mass; extending between the habenular commissure and posterior commissure and covering the roof of the IIIrd ventricle.

In young individuals, pineal parenchyma shows two populations of pinealocytes (PI and PII) distinguished by the density of their nucleus and cytoplasm. Interstitial spaces are occupied by fibroblast-like cells and collagen fibers and numerous neuropile elements filled with microtubules and nerve endings containing microvesicles and dense core vesicles. Clear pinealocytes (PI), the most numerous cells, are characterized by a developed Golgi and large clear associated vacuoles apparently conveyed to their extensions and bulbous endings. In the PII cells, perinuclear space is dilated and the granular reticulum cisternae well developed with moderate Golgi activity. These features suggest that PI and PII cells are an expression of two functional states of a single type of PIs.

In aging individuals, cytological characteristics of PI cells are altered. In the nucleoplasm, we note accumulation of compact inclusions and a modified nucleolus size and

shape. Cytoplasm becomes heterogeneous by the apparition of densified regions. A gritty material sometimes associated to crystalloid fibrils accumulates inside and outside mitochondria. In the dilated lumen of reticulum, cisterns can be observed one or several dense granules. The activity of dictyosomes is markedly reduced and clear vacuoles are almost absent. Increased number of dense bodies seems to participate with altered mitochondria and lipid globules to the formation of big and heteromorphic concretions. As a whole, the changes observed suggest a slower pinealocyte metabolism during the aging process. These observations confirm the decline of melatonin levels registered in aging shrews.

1. Introduction

L'intégrité fonctionnelle des organismes vivants dépend du maintien de la synchronisation des différentes variables oscillatoires internes au rythme environnemental. Il est bien établi que les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus et la glande pinéale des mammifères jouent un rôle essentiel dans la régulation des fonctions rythmiques journalières (rythmes de veille sommeil, d'activité locomotrice) et saisonnières (reproduction, croissance) [1–5]. Les NSC sont le siège de l'horloge biologique circadienne dont l'activité est synchronisée sur le cycle lumière/obscurité de 24 heures ; l'information photopériodique est captée par un petit groupe de cellules ganglionnaires de la rétine dont les axones constituent le tractus rétino-hypothalamique innervant les NSC. L'activité rythmique des NSC est transmise à la glande pinéale via une voie nerveuse complexe dont le dernier relais est situé dans les ganglions cervicaux supérieurs, lesquels envoient une innervation catécholaminergique vers la glande. La libération nocturne de noradrénaline stimule la production de mélatonine. Le profil nocturne de la sécrétion de mélatonine est une constante chez tous les vertébrés, même si les systèmes de contrôle de sa production ont été profondément modifiés au cours de l'évolution : ils sont passés progressivement d'une sensibilité directe à la lumière dans la pinéale des ectothermes au mode indirect décrit plus haut dans celle des mammifères [6,7]. Ainsi, la mélatonine est le donneur de temps interne des vertébrés, ou aiguille hormonale des horloges biologiques. Chez les mammifères, les deux cibles majeures de la mélatonine sont les NSC eux-mêmes et des cellules de la *pars tuberalis* de l'adénohypophyse [8,9].

De nombreuses études chez l'animal montrent une perte de la rythmicité circadienne au cours du vieillissement [10,11] qui se traduit par une altération des rythmes de veille/sommeil, des déficiences de la locomotion et de

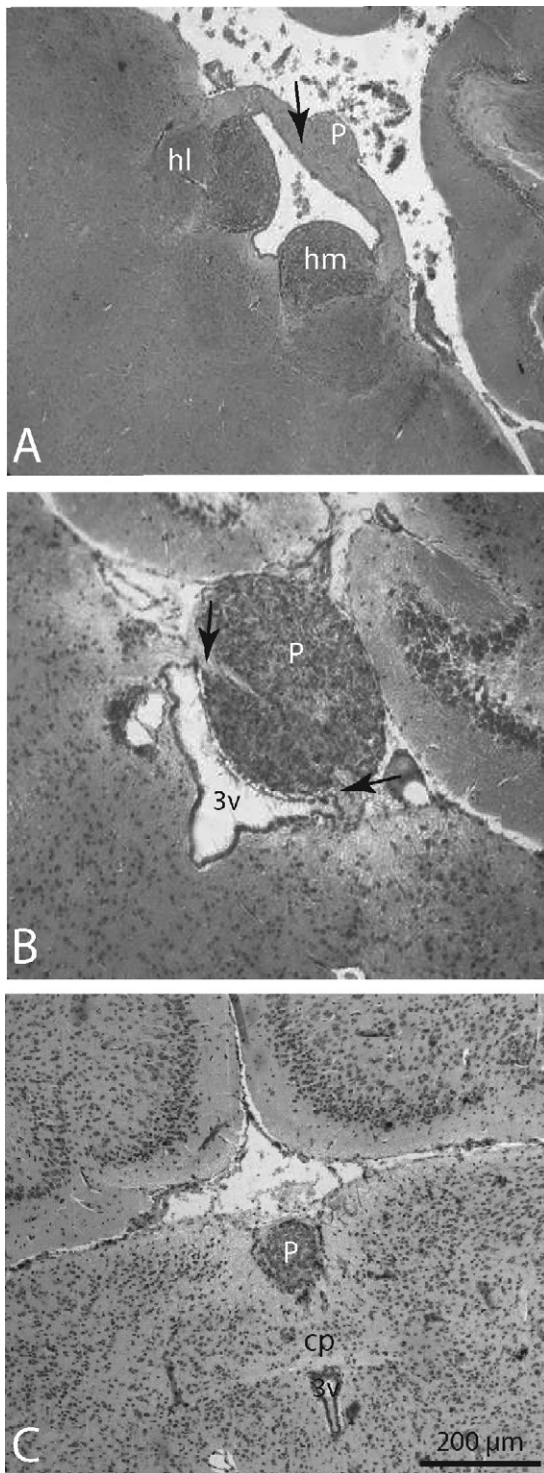


Fig. 1. Micrographies de microscopie photonique sur coupes séries frontales d'épithalamus montrant la progression du tissu pinéal chez *Crocidura russula*. Dans sa partie proximale (A), la glande pinéale (P) de forme ovoïde est au contact de la commissure interhabénulaire (flèche), qui la relie latéralement aux noyaux habénulaires médians (hm). Dans sa partie moyenne (B), la glande (P) est à son expansion maximale ; de forme sphérique elle coiffe le III^e ventricule (3V) auquel elle est raccordée par les fibres commissurales (flèche). Postérieurement (C) la glande (P) régresse,

l'attention, voire des capacités cognitives [12–14]. Cette altération peut avoir des causes multiples, telle la perte de la photosensibilité rétinienne ou une dégénérescence des neurones du NSC (au demeurant peu nombreux) [15,16] ; l'absence de signal catécholaminergique rythmique en résultant entraînerait une perte du rythme d'activité de la pinéale. Par ailleurs, il a été montré que la sécrétion pinéale de mélatonine diminue progressivement au cours de l'âge chez les mammifères (hamsters [17,18], rat [19,20]) dont l'Homme [21]. Mais cette perte pourrait aussi venir d'une dégénérescence des cellules pinéales elles-mêmes sans qu'il y ait nécessairement altération de la rétine ou du NSC. À l'appui de cette hypothèse, l'âge entraîne une diminution de la sécrétion de mélatonine également chez le poisson zèbre [22], chez lequel la production de mélatonine est indépendante du NSC [23]. Relativement peu de données concernent la glande pinéale des animaux vieillissants. En dehors de la perte du rythme de production de la mélatonine ont été notées une diminution du nombre des récepteurs β à la noradrénaline, et quelques altérations de structure concernant la forme du noyau, une diminution du nombre de certains organites cytoplasmiques (en particulier le réticulum endoplasmique), une augmentation du tissu conjonctif, des lysosomes et de la calcification [24,25].

La musaraigne musette, *Crocidura russula*, est particulièrement intéressante pour les études sur le vieillissement. En effet, elle présente une durée de vie très courte (14 à 18 mois) dans la nature qui se trouve prolongée en captivité. Les individus peuvent en effet survivre jusqu'à l'âge de 26 à 30 mois. L'ensemble des traits de vie sont maintenus en captivité, seule la phase de sénescence se trouve allongée. La perte avec l'âge (dès la deuxième année) des activités rythmiques journalières et saisonnières est bien documentée chez cette espèce : on note une chute des taux de mélatonine plasmatique et glandulaire nocturnes, une arythmie de l'activité locomotrice, du métabolisme et de la prise de nourriture sur la journée [26,27]. De plus, l'administration de mélatonine dès l'âge de 1 an ralentit la dégradation du rythme d'activité locomotrice liée à l'âge [27]. Dans cette perspective, il nous a semblé intéressant de comparer la structure de la glande pinéale de musaraignes jeunes et âgées.

2. Matériel et méthodes

Des crocidures du genre *C. russula* capturées dans la région de Banyuls-sur-Mer (Pyrénées-Orientales, France) ont été maintenues en élevage dans l'animalerie du Centre

prend la forme d'un cône inversé et devient séparée du III^e ventricule (3V) par la commissure postérieure (cp). Noyaux habénulaires latéraux (nl).

Fig. 1. Frontal serial sections micrographs of the epithalamus showing the progress of the pineal gland in *Crocidura russula*. In the proximal part (A), the pineal gland (P) of ovoid shape is in contact with the interhabenular commissure (arrow) which connect laterally to the lateral habenular nuclei (hl). In the middle of the epithalamus (B), the gland is at its maximum expansion. Spherical in shape, it caps the IIIrd ventricle (3V) to which it is connected by commissural fibers (arrow). In the back part (C), the gland (P) declines and takes a shape of inverted cone. It becomes separated from the IIIrd ventricle (3V) by the posterior commissure (CP).

d'Écologie Évolutive et Terrestre de l'Observatoire Océanologique. Dans la chambre, la température est de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, la photopériode de 12L : 12D (La phase claire débutant à 7 h 00). Ce cycle standard écarte l'effet connu des photopériodes courte et longue sur les caractéristiques cytologiques de la glande pinéale. L'accès à la nourriture et à l'eau de boisson est libre.

Au total, 9 individus de la génération F1 d'âge connu ont été utilisés. Pour l'étude ultrastructurale de la glande pinéale, des musaraignes jeunes de 1 à 4 mois ($n=3$) et sénescents de 25 à 28 mois ($n=3$) ont été sacrifiées par décapitation pendant la phase lumineuse (entre 14 h et 16 h), les glandes pinéales ont été prélevées et rapidement plongées dans une solution contenant 4 % de paraformaldéhyde (préparé extemporanément) et 2,5 % de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate à 0,1 M à un pH de 7,3. Après une nuit à 4°C , elles ont été rincées dans le tampon et post-fixées dans une solution de tetroxyde d'osmium (OsO_4) à 1 % (1 h à Température ambiante). Après déshydratation à l'alcool, les glandes ont été incluses dans l'Araldite. Les coupes ultrafines, obtenues sur un ultramicrotome LKBIII (Leica), ont été observées au microscope électronique (HITACHI 7500) après contraste à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb [28]. Sur trois autres individus, le cerveau a été prélevé en entier, fixé dans le liquide de Bouin [29], puis inclus dans la paraffine (Paraffin Wax Riedel-de Haën). Les blocs ont été débités en coupes sériées frontales de $5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur et colorées à l'azan de Heidenhein pour l'étude de l'évolution topographique de la glande pinéale.

3. Résultats

3.1. Anatomie de la glande pinéale de *Crocidura russula*

L'analyse de coupes sériées frontales d'encéphales de crocidures montre que le parenchyme pinéal se présente en une entité unique coniforme s'étendant dans le plan antéropostérieur entre la commissure habéculaire (Fig. 1A) et la commissure postérieure (Fig. 1C). La glande est à son expansion maximale à la verticale de la région moyenne de l'épithalamus ; de section sphérique, elle recouvre le toit du troisième ventricule et reste reliée aux noyaux habéculaires latéraux par la commissure habéculaire (Fig. 1B).

3.2. Modifications ultrastructurales du parenchyme pinéal au cours de l'âge

L'analyse comparée des coupes provenant des crocidures jeunes et âgées montre des différences entre les deux groupes.

3.2.1. Chez les jeunes crocidures (1 à 4 mois)

Le parenchyme pinéal renferme deux populations de pinéolocytes qui se distinguent par leur densité aux électrons. Ceux à noyau et cytoplasme clairs, les plus nombreux, correspondent aux pinéolocytes clairs ou pinéolocytes de type I (PI). Ils sont caractérisés par un corps cellulaire polygonal ou ovalaire qui émet un fin

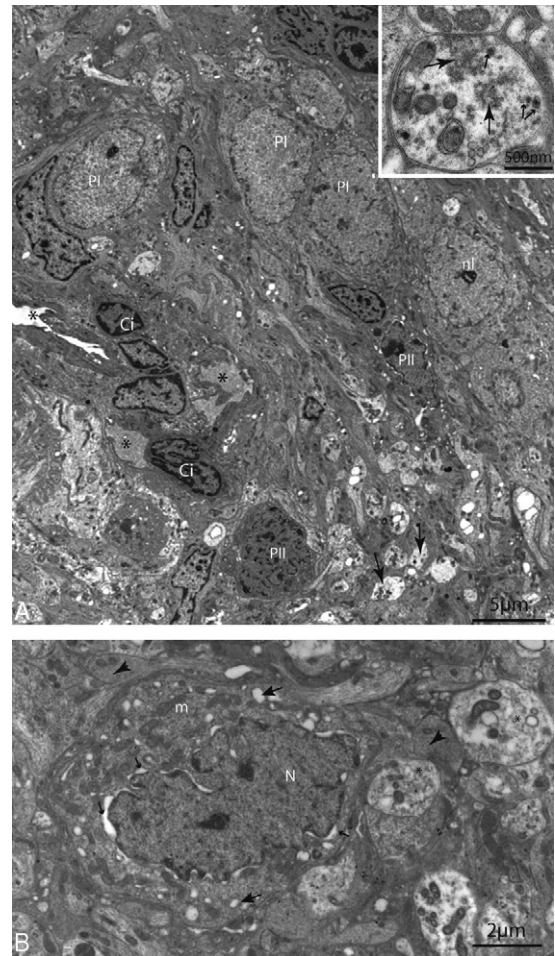


Fig. 2. Micrographies de microscopie électronique du parenchyme pinéal jeune. La vue d'ensemble (A) montre des pinéolocytes d'aspect clairs (PI) nombreux à noyaux indentés et nucléoles proéminents (nl), des pinéolocytes sombres (PII) moins nombreux et plus petits, des cellules interstitielles (Ci) en bordure des espaces vasculaires (*). Entre les corps cellulaires s'observent des sections de terminaisons pinéolocytaires (tête de flèche) et des terminaisons nerveuses (flèches). Celles-ci (encart) renferment des vésicules à cœur dense (petite flèche) et de nombreuses microvésicules (grandes flèches). Au fort grossissement (B), le corps cellulaire du pinéolocyte sombre (PII) montre un nucléoplasme dense, un espace périplasmique dilaté (petites flèches), un réticulum endoplasmique développé (grandes flèches), des dictyosomes courts (D) et des mitochondries nombreuses (m). Notez les sections de leurs prolongements et terminaisons (tête de flèche) plus opaques que celles des PI.

Fig. 2. Young pineal parenchyma electron micrographs. Overview (A) parenchyma shows numerous clear pinealocytes (PI) with highly folded nucleus and prominent nucleolus (nl), dark pinealocytes (PII) are fewer and smaller, interstitial cells (Ci) borders the vascular spaces (*); between cell bodies are seen sections of pinealocyte (arrow head) and nerve (arrow) endings. Nerve ones (insert) contain numerous microvesicles (big arrow) and dense core vesicles (small arrow). High magnification (B) of dark pinealocyte (PII) pericarya showing denser nucleoplasm and dilated periplasmic space (small arrow), well developed endoplasmic reticulum (big arrow), short dictyosomes (D) and numerous mitochondria (m). Note the sections of their processes and endings (arrow head) are more opaque than those of PI.

prolongement long et sinueux, leur noyau présente de profondes indentations et renferme une chromatine finement dispersée. Le nucléole est proéminent et bien ségrégué (Fig. 2A). Le cytoplasme des PI renferme de

nombreuses mitochondries, des profils ergastoplasmiques et plusieurs dictyosomes (Fig. 3A). Ces derniers paraissent très actifs, leurs saccules souvent dilatés sont associés à de petites vésicules claires (Fig. 3B) qui semblent fusionner pour donner naissance à de larges vacuoles dont le contenu prend un aspect flocculent (Fig. 3C). Ces vacuoles seraient véhiculées du corps cellulaire (Fig. 4A) et tout le long des prolongements pour s'accumuler au niveau des terminaisons pinéaloxytaires bulbuses. Elles pourraient constituer un produit de sécrétion de ces cellules (Fig. 4B et C).

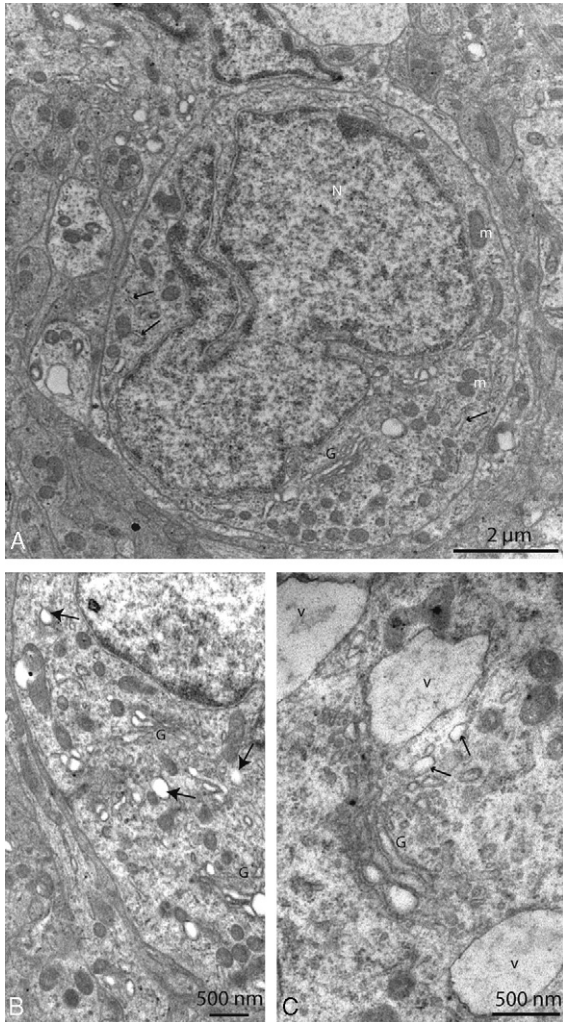


Fig. 3. Organites caractéristiques des PI. (A), mitochondries (*m*) et dictyosomes (*D*), noyau (*N*) riche en euchromatine est fortement indenté. Profils ergastoplasmiques courts et peu abondants (*flèche*). Au fort grossissement (B et C), les dictyosomes golgiens (*D*) montrent des saccules dilatés associés à plusieurs vésicules claires (*flèche*) qui semblent fusionner (*petites flèches*) pour former de larges vacuoles (*V*) à contenu floconneux.

Fig. 3. Organelles typically present in PI Cell body are indicated (A), mitochondria (*m*), dictyosomes (*D*), infolded nucleus (*N*) rich in euchromatin, few short cisterns of endoplasmic reticulum (*arrow*). High magnification (B and C micrographs) show, widened Golgi saccules (*D*) surrounded by numerous clear vesicles (*arrows*), note their possible fusion (*small arrow*) forming large vacuoles containing flocculent material (*V*).

Les pinéaloxytaires de la deuxième population sont d'aspect dense, ils correspondent aux pinéaloxytaires sombres ou pinéaloxytaires de type II (PII). Moins nombreux que les PI, ils sont de plus petite taille et leur noyau plus riche en hétérochromatine compte un à deux nucléoles. Leur cytoplasme renferme un réseau ergastoplasmique plus développé que celui des PI, des mitochondries aussi nombreuses et des dictyosomes courts et éparés (Figs. 1A et B). En plus des éléments du neuropile, s'observent des terminaisons nerveuses (Fig. 2A) caractérisées par la présence de vésicules à cœur dense et de nombreuses microvésicules (Fig. 2A encart). Les cils et les rubans synaptiques, structures habituellement décrites dans la

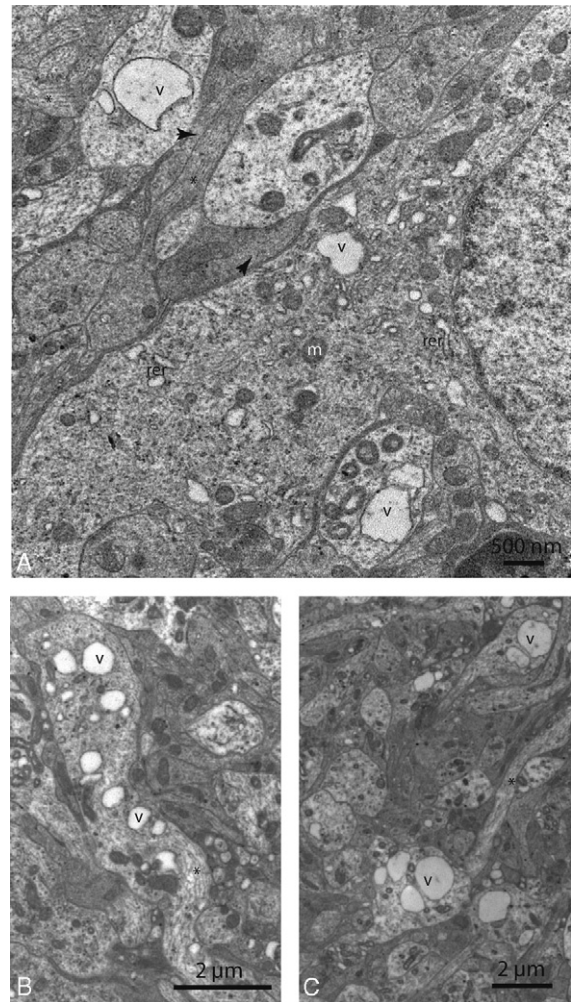


Fig. 4. Les vacuoles claires (*V*) semblent transportées grâce aux faisceaux de microtubules (*) du corps cellulaire (A) le long des prolongements (B) pour s'accumuler dans les terminaisons bulbuses (C). Noter l'absence de ces vacuoles des prolongements de PII environnants (*tête de flèche*). Réticulum granulaire (*rer*) ; mitochondries (*m*).

Fig. 4. Micrographs indicating the possible transport of clear vacuoles (*v*), on bundles of microtubules (*) from the cell bodies (A) along the processes (B) to accumulate in the bulbous endings (C). Note the absence of these vacuoles in the surrounding PII processes (*arrow head*). Endoplasmic reticulum (*rer*), mitochondria (*m*).

glande n'ont pas été observés dans les pinéaloctes de cette espèce.

3.2.2. Chez les crocidures âgées (25 à 28 mois)

Le tissu pinéal montre de profondes modifications aussi bien au niveau nucléaire que cytoplasmique (Fig. 5) par rapport aux jeunes spécimens. Les noyaux sont à contours réguliers. Dans leurs nucléoplasmes pâle s'observent

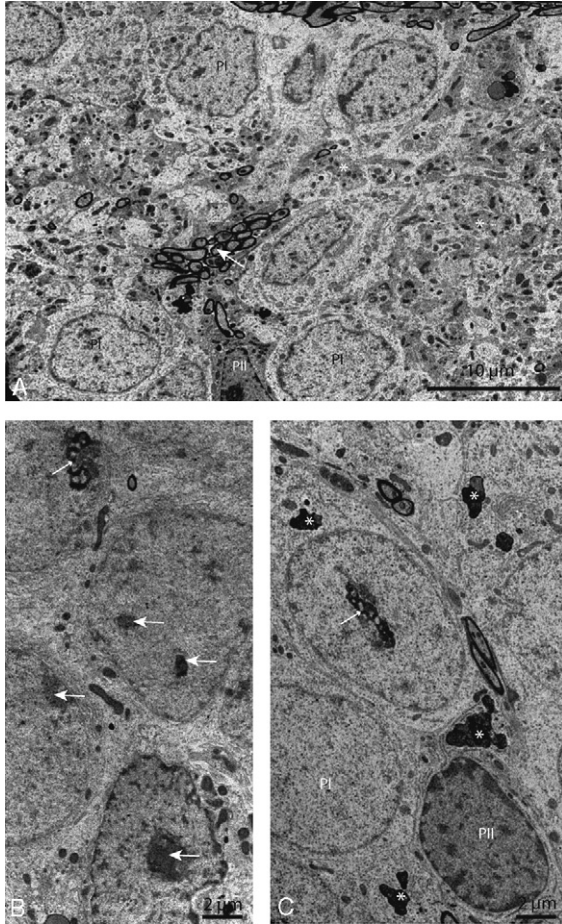


Fig. 5. Micrographies de microscopie électronique montrant les modifications du parenchyme âgé. Au faible grossissement, (A) les pinéaloctes clairs (PI) toujours nombreux montrent un cytoplasme parsemé de plages densifiées (*). Les pinéaloctes sombres (PII) ne montrent pas de modifications notables. Noter ici, un amas de fibres myélinisées issues des fibres commissurales traversant le parenchyme (flèche). Le fort grossissement (B et C) montre des noyaux à contours réguliers et nucléoplasme pâle renfermant plusieurs inclusions compactes (flèche), des nucléoles hétéromorphes et hétérogènes avec des images de ségrégation en rosettes ou lame festonnées (petite flèche). Noter aussi la fréquence de corps denses dans le cytoplasme (*).

Fig. 5. Electron micrographs showing the changes in aged parenchyma. At low magnification (A), clear pinealocytes (PI) show beaches of densified cytoplasm (*) and unchanged dark pinealocytes (PII). Note here, a cluster of myelinated commissural fibers crossing the parenchyma (arrow). At high magnification, B and C micrographs show, nuclei with regular contours and pale nucleoplasm containing several dense compact inclusions (arrows), unusual heterogeneous nucleoli segregated in rosettes or scalloped blade (small arrow). Note the frequency of polymorphous dense bodies (*) in the cytoplasm.

plusieurs inclusions d'aspect compact suggérant des altérations chromatiniennes (Fig. 5B). Les nucléoles sont très hétérogènes d'un noyau à un autre et offrent des images de ségrégation en forme de rosettes ou de lames festonnées plus ou moins étendues (Fig. 5C). Le cytoplasme des PI montre une densité variable et des concrétions fréquentes (Fig. 5A). Les vacuoles claires associées aux dictyosomes, nombreuses chez les jeunes

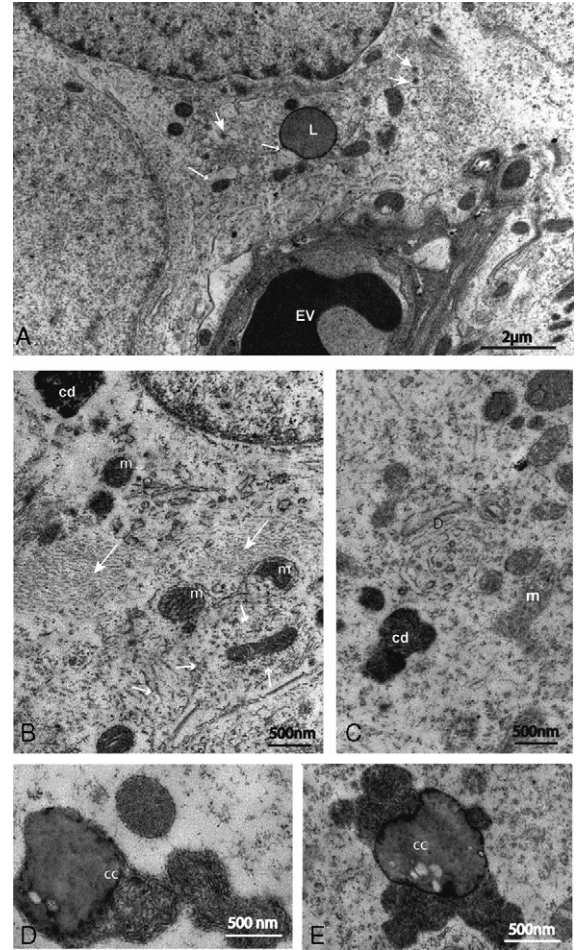


Fig. 6. Modifications des organites cytoplasmiques. (A) les cavités du réticulum endoplasmique sont dilatées et renferment un à plusieurs granules opaques (flèches) avec des images d'association à des globules lipidiques (L). (B) mitochondries à matrices densifiées (m) entourées d'une trame de fibres cristalloïdes (petites flèches), présence d'agrégats de fibres du cytosquelette (grandes flèches). (C) Dictyosomes (D) peu actifs, noter l'absence de vacuoles claires à leur voisinage. Espace vasculaire (EV); corps dense (cd). Images de structures concrétiques volumineuses associant globule lipidique et mitochondries modifiées (D) et/ou corps denses et globule lipidique (E).

Fig. 6. Modified organelles in clear pinealocytes (A), dilated endoplasmic reticulum cisternae containing one or several granules (arrows) sometimes associated to lipid droplets (L). On (B), numerous mitochondria with densified matrix (m) surrounded by a web of crystalloid fibers (small arrows), cytoplasmic aggregates of cytoskeleton fibers (big arrows). In (C), note the absence of clear vacuoles near the Golgi saccules (D). Dense bodies (cd); vascular space (EV). Micrographs D and E show large heteromorphic and heterogeneous concrete structures consisting of an association between modified mitochondria and lipid droplets in (D) and between dense bodies and lipid droplets in (E).

individus, ne sont plus observées à cet âge. Les citernes du réticulum sont plus dilatées et renferment souvent un ou plusieurs granules de taille variable, opaques aux électrons souvent liés à des globules lipidiques ; cette association pourrait être à l'origine des corps denses nombreux et hétéromorphes (Fig. 6A et B). Les mitochondries aussi nombreuses que chez les jeunes individus sont cependant modifiées. Certaines sont turgescentes, mais la majorité présente une matrice densifiée par un dépôt poudreux et/ou filamenteux. Autour d'elles s'accumulent des fibres cristalloïdes (Fig. 6B et C). De plus, l'apparition d'agrégats de fibres dans le cytoplasme suggère une altération des éléments du cytosquelette. La transformation marquée chez ce groupe est révélée par l'abondance des corps denses et l'apparition de formations concrétiques. Celles-ci, hétéromorphes et de très grande taille sont disséminées dans tout le parenchyme. Des images de proximité entre compartiments granulaires et globules lipidiques et entre mitochondries modifiées et corps denses permettent de suggérer que l'accumulation et ou l'altération de ces différentes structures seraient à l'origine de la formation de ces concrétions (Fig. 6D et E).

4. Discussion

Cette étude nous a permis d'observer pour la première fois l'anatomie topographique de la glande pinéale de *C. russula* et de relever les altérations cytologiques liées à l'âge.

4.1. Caractéristiques générales du tissu pinéal chez *Crocodyrus russula*

4.1.1. Position anatomique comparée de la glande pinéale

Au regard des distinctions de forme et de position de la glande pinéale chez les différents ordres de mammifères étudiés, la glande se présente chez *C. russula*, en une seule entité coniforme au contact du III^e ventricule. Selon la classification de Vollrath (1981) [30], cette topographie correspond au type proximal ou le type « A ». Cette position a également été rapportée chez d'autres espèces d'Insectivores : *Talpa europea*, *Blarina brevicauda* et de Chiroptères : *Myotis sodalis* et *Myotis lucifugus* mais aussi chez des espèces d'Ongulés (le cheval, le mouton) et des Primates (le chimpanzé et l'Homme) (pour revue, voir [30]). La glande pinéale de *C. russula*, par son anatomie plus proche de celle de l'Homme que ne l'est la pinéale des rongeurs [31,32], pourrait constituer un modèle plus adéquat pour les études sur cette glande.

4.1.2. Composition cellulaire de la glande

La nomenclature des pinéaloctes est très variable d'une espèce à une autre, voire d'une étude à une autre. Chez *C. russula*, nous avons pu identifier des pinéaloctes d'aspect clair (PI) et d'autres sombres ou (PII). La pinéale du lapin [33], celle de certaines espèces de taupes [34] et [35], de la noctule [36], du renard [37] et de la gerbille [38] renferment également deux types de pinéaloctes. D'après certains auteurs [39,40], ces cellules diffèrent non seulement par leur osmophilie mais aussi par leurs activités sécrétoires. Chez *C. russula*, les caractéristiques

cytologiques suggèrent que les deux variantes, claire et sombre, pourraient représenter un type unique de pinéaloctes exprimant deux états fonctionnels. Les pinéaloctes sombres (type II) pourraient être en phase d'initiation de la protéosynthèse comme le suggère, l'espace périnucléaire dilaté, l'extension du réseau ergastoplasmique et l'absence de vacuole claire en leur sein, alors que le type clair (PI) pourrait être en phase d'emballage et d'adressage des produits, tel que le suggère l'abondance des vacuoles claires au voisinage de saccules golgiens distendus.

Au moins deux processus sécrétoires ont été décrits dans les pinéaloctes, le processus « neurosecretory-like », caractérisé par la formation, à partir des saccules golgiens, de vésicules à cœur dense, et le processus « neuroependymal-like » caractérisé par l'accumulation d'un matériel protéique dans les citernes du réticulum endoplasmique rugueux [39]. Chez *C. russula*, l'activité sécrétoire des pinéaloctes est matérialisée par la formation, à partir du golgi, de vacuoles claires. Des vacuoles de même aspect mais apparemment d'origine ergastoplasmique ont été décrites chez d'autres mammifères Insectivores notamment le hérisson, la chauve-souris, le rat taupe et le rat kangourou [34,36,39,41,42]. Chez la gerbille, Rongeur déserticole, ces vacuoles sont exclusivement produites par les pinéaloctes de type II et leur nombre et taille suivent un rythme saisonnier [38]. Il semblerait que les deux processus sécrétoires décrits ne soient pas uniques dans la glande et ne peuvent être généralisés à toutes les espèces puisque chez *C. russula* les vacuoles claires, de type épendymaire, sont d'origine golgienne. Il est bien connu que l'activité de la glande pinéale est intimement liée aux phases du cycle nyctéméral ainsi qu'à la fonction de reproduction de l'espèce ; c'est pourquoi nous pensons que les différences interspécifiques relevées pourraient aussi résulter des moments de la journée et de l'année auxquels ont été réalisés les prélèvements pour les différentes études publiées. De plus, chez *C. russula*, les vacuoles claires sont abondantes dans les prolongements pinéaloctaires, suggérant une libération possible dans les espaces interstitiels, tel que rapporté chez le rat [43], le rat du coton *Sigmodon hispidus* [44] et la Gerbille *Gerbillus pyramidum* [38]. Chez cette dernière, les vacuoles claires ont un contenu glycoprotéique [38]. Une étude du tissu pinéal de *C. russula* au cours du cycle nyctéméral permettra de mieux apprécier la signification physiologique de ces produits pour la glande.

4.2. Altérations ultrastructurales du tissu pinéal au cours de l'âge

Nos observations montrent chez les musaraignes âgées, de profondes modifications au niveau des pinéaloctes. Ce résultat est en accord avec les travaux antérieurs réalisés chez d'autres espèces [45–47] et suggère une altération du tissu pinéal au cours de l'âge. Ainsi, les inclusions compactes intranucléaires et la morphologie inhabituelle des nucléoles pourraient indiquer une atteinte de l'ADN pinéaloctaire. Ceci rejoint les observations de Johnson [48] signalant la présence d'inclusions nucléaires dans les pinéaloctes de rats âgés et ceux de Humbert et Pévet [49]

qui identifient des précipités de calcium dans les noyaux de pinéaloctes sombres (PII) chez les rats âgés.

La structuration de la chromatine dans le noyau est régulée par les histones et les protéines du nucléosquelette. Les modifications nucléaires relevées pourraient résulter d'une altération de ces protéines. En effet, *in vitro*, une diminution et/ou altération des histones sont associées aux détériorations chromatiniennes caractérisant les cellules eucaryotes âgées [50]. D'autres études rapportent une multiplication des foyers d'ADN endommagé et une modification de la localisation des lamines A dans des cellules humaines âgées [51].

Dans le cytoplasme, l'absence de vacuoles claires au voisinage des dictyosomes golgiens pourrait représenter un affaiblissement de l'activité sécrétoire des pinéaloctes sénescents. Une rétraction de l'aire golgienne et une réduction du nombre de vésicules qui lui sont associées ont également été observées dans les pinéaloctes de *Peromyscus leucopus* âgés de 28 mois [52]. Parallèlement, les citernes du réticulum et les mitochondries sont fortement modifiées confirmant les observations d'Humbert et Pévet chez le rat [35].

Le changement le plus marqué dans les pinéaloctes âgés est l'accroissement du nombre et de la taille des corps denses et la fréquence des corps concrétiques. Ces observations rejoignent celles rapportées chez le rat [45,46,53], la gerbille de Mongolie [54], le cheval [55] et l'Homme [56]. Les corps denses ou granules de lipofuschine sont des structures associées à l'involution sénile des tissus ; leur fréquence chez ce groupe traduirait un accroissement de l'activité lytique suggérant ainsi une accélération du taux de destruction des composants cellulaires. D'après Bondareff [45], ces structures présentent une activité phosphatase acide. Ces données combinées à nos observations pourraient expliquer la réduction de l'activité sécrétoire des pinéaloctes âgés chez *C. russula*.

Les concrétions pinéales également appelées *corpora arenacea acervuli*, ou sables épiphysaires ont été décrites dans la glande pinéale de nombreuses espèces. Toutefois leur signification physiologique n'est pas encore connue. Nos observations montrent qu'elles sont caractéristiques des pinéaloctes sénescents. Ces observations rejoignent celles rapportées chez le rat [57] et chez la gerbille de Mongolie [58].

L'expansion en nombre et en taille de ces structures dans un environnement pinéaloctaire modifié, chez *C. russula*, évoque fortement un état dégénératif de la glande au cours de la sénescence. Cet état serait secondaire à des modifications du métabolisme pinéaloctaire comme l'atteste la densification du cytoplasme et la réduction des organites impliqués dans les activités de synthèse et de sécrétion. Chez la gerbille de Mongolie, les concrétions pinéales sont observées dans diverses situations expérimentales [58–60] et leur abondance est au contraire expliquée par une intensification de l'activité métabolique de la glande [61,62].

Parmi les espèces étudiées, les concrétions montrent de grandes différences individuelles et interspécifiques [30,46,57,58,63,64]. Aussi, différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer leur origine. Elles proviendraient

des pinéaloctes vacuolaires, chez la gerbille de Mongolie [58] et des pinéaloctes sombres chez le rat [63]. Ces sites bien que différents en apparence correspondent chacun à un environnement riche en Ca^{++} . Ainsi, la minéralisation de l'environnement pinéaloctaire serait favorable à l'apparition des concrétions. Chez *C. russula*, l'apparition des granules denses dans des citernes de réticulum endoplasmique dilatées comme chez la gerbille [40,44] et la densification de la matrice mitochondriale et de son environnement comme chez le rat [63], laisse penser que ces compartiments seraient des sites de minéralisation dans les pinéaloctes et, par conséquent, de la formation des concrétions. En effet, il est bien connu que ces organites sont des sites de stockage du Ca^{++} . De plus, plusieurs travaux ont démontré leur susceptibilité à la minéralisation [65–67]. Humbert et Pévet [63] montrent chez le rat âgé, la présence de calcium et de phosphore dans les vésicules et vacuoles provenant du réticulum endoplasmique. Ces données combinées à nos observations nous amènent à penser qu'une minéralisation du contenu ergastoplasmique pourrait perturber les processus d'emballage et de sécrétion dans le pinéaloctes expliquant ainsi la réduction du nombre de vacuoles claires à cet âge ce qui appuie davantage l'hypothèse d'une dégénérescence du tissu au cours de l'âge. Les caractéristiques de la composante neuronale comparables chez les individus jeunes et âgés laissent penser que les modifications observées sont intrinsèques aux cellules pinéales et ne semblent pas relever d'une altération de leur contrôle nerveux.

5. Conclusion

La glande pinéale de *C. russula*, est de type proximal (type A) ; cette topographie est similaire à celle des autres Insectivores et des Primates y compris l'Homme. Les deux populations de pinéaloctes qui y sont identifiées sont le reflet de deux états d'activité d'un même et unique type cellulaire. Leur activité sécrétoire est matérialisée par la formation de larges vacuoles claires.

Au cours de l'âge, la glande pinéale de *C. russula* subit des altérations ultrastructurales touchant essentiellement ses cellules majoritaires, les Pinéaloctes de type I, et ce, par la densification du cytoplasme et de la matrice mitochondriale, la multiplication des corps denses et des corps concrétiques et la raréfaction des produits de sécrétion. Ces modifications rappellent celles rapportées chez les Rongeurs et l'Homme. Elles sont évocatrices d'un processus de ralentissement du métabolisme cellulaire. Compte tenu des caractéristiques de la composante neuronale, similaires chez les crocidures jeunes et âgées, nous pensons que les différences relevées sont intrinsèques aux pinéaloctes et n'impliquent, en apparence, pas leur contrôle nerveux, au moins sur le plan ultrastructural.

Dans leur ensemble, nos observations viennent confirmer les résultats de Magnanou et al. en 2009 [27] et apportent la preuve que la réduction progressive du taux de mélatonine enregistrée avec l'âge, chez *C. russula*, est secondaire à un affaiblissement de l'activité des pinéaloctes au cours du processus de sénescence.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Ce travail a été réalisé sur la Plateforme de Cytométrie et d'Imagerie de l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer.

Références

- [1] I. Zucker, T.M. Lee, J. Dark, The suprachiasmatic nucleus and annual rhythms of mammals, in: D.C. Klein, R.Y. Moore, S.M. Reppert (Eds.), *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*, Oxford University Press, New York, 1991, pp. 246–259.
- [2] R.Y. Moore, The organisation of the human circadian timing system, *Prog. Brain Res.* 93 (1992) 101–117.
- [3] C. Cajochen, K. Krauchi, A. Wirz-Justice, Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep, *J. Neurobiol.* 15 (4) (2003) 432–437.
- [4] J.A. Elliott, L. Tamarkin, Complex circadian regulation of pineal melatonin and wheel-running in Syrian hamsters, *J. Comp. Physiol. A* 174 (1994) 469–484.
- [5] J.M. Darrow, B.D. Goldman, Circadian regulation of pineal melatonin and reproduction in the Djungarian hamster, *J. Biol. Rhythms* 1 (1985) 39–54.
- [6] J.P. Collin, J. Arendt, W.A. Gern, *Le troisième œil*, *La Recherche* 19 (2003) (1988).
- [7] J. Falcón, Cellular circadian clocks in the pineal, *Prog. Neurobiol.* 58 (2) (1999) 121–162.
- [8] M.L. Dubocovich, S. Benloucif, M.I. Masana, Melatonin receptors in the mammalian suprachiasmatic nucleus, *Behav. Brain Res.* 73 (1996) 141–147.
- [9] F. Gauer, M. Masson-Pévet, P. Pévet, Seasonal ultrastructure of melatonin receptors in rodent *pars tuberalis*: correlations with reproductive state, *J. Neural Transm.* 96 (3) (1994) 187–195.
- [10] F.W. Turek, P. Penev, Y. Zhang, O. Van Reeth, P.C. Zee, Effect of age on the circadian system, *Neurosc. Biobehav. Rev.* 19 (1995) 53–58.
- [11] L. Weibel, F.W. Turek, E. Mocaer, O. Van Reeth, A melatonin agonist facilitates circadian resynchronization in old hamsters after abrupt shifts in the light-dark cycle, *Brain Res.* 880 (2000) 211–297.
- [12] T. Schochat, J. Loredó, S. Ancoli-israel, Sleep disorders in the elderly, *Curr. Options Neurol.* 3 (2001) 19–36.
- [13] P.D. Penev, P.C. Zee, F.W. Turek, Quantitative analysis of the age-related fragmentation of hamster 24-h activity rhythms, *Am. J. Physiol. Reg. I* 273 (1997) 2132–2137.
- [14] E. Ferrari, F. Magri, Role of neuroendocrine pathways in cognitive decline during aging, *Ageing Res. Rev.* 7 (2008) 225–233.
- [15] M. Boulton, M. Rózanowska, T. Wess, Ageing of the retinal pigment epithelium: implications for transplantation, *Graef's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 242 (2004) 76–84.
- [16] F. Aujard, F. Cayetanot, M. Bentivoglio, M. Perret, Age-related effects on the biological clock and its behavioral output in a primate, *Chronobiol. Int.* 23 (2006) 451–460.
- [17] R.J. Reiter, B.A. Richardson, L.Y. Johnson, B.N. Ferguson, D.T. Dinh, Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamster, *Science* 210 (1980) 1372–1373.
- [18] S.F. Pang, P.L. Tang, Decreased serum and pineal concentrations of melatonin and *N*-acetylserotonine in aged male hamster, *Hormone Res.* 17 (1983) 228–234.
- [19] R.J. Reiter, C.M. Craft, L.Y. Johnson, T.S. King, B.A. Richardson, G.M. Vaughan, Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats, *Endocrinology* 109 (1981) 1295–1297.
- [20] S.F. Pang, F. Tang, P.L. Tang, Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal *N*-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats, *J. Exp. Zool.* 229 (1984) 41–47.
- [21] R.J. Reiter, The aging pineal gland and its physiological consequences, *Bio-essays* 14 (1992) 169–175.
- [22] I.V. Zhdanova, L. Yu, M. Lopez-Patino, E. Shang, S. Kishi, E. Gueling, Aging of the circadian system in zebra fish and the effects of melatonin on sleep and cognitive performance, *Brain Res. Bull.* 75 (2–4) (2008) 433–441.
- [23] R.R. Noche, P.N. Lu, L. Goldstein-Kral, E. Glasgow, J.O. Liano, Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain, *BMC Neurosci.* 12 (7) (2011).
- [24] L. Vollrath, The human pineal gland, *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen*, VI/7, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981, pp. 1–665.
- [25] Y. Toutou, E. Haus, Aging of the human endocrine and neuroendocrine time structure, *Aging Clock* 719 (1994) 378–397.
- [26] R. Fons, Premières données sur l'écologie de la *Pachyure étrusque Suncus etruscus* (Savi, 1822) - comparaison avec deux autres *Crocidurinés*, *Crocidura russula* (Hermann, 1780) et *Crocidura suaveolens* (Pallas, 1811) (Insectivore, Soricidae), *Vie et Milieu* 25 (1975) 315–359.
- [27] E. Magnanou, J. Attia, R. Fons, G. Bœuf, J. Falcon, The timing of the shrew: continuous melatonin treatment maintains youthful rhythmic activity in aging *Crocidura russula*, *PLoS ONE* 4 (6) (2009) e5904.
- [28] J. Pottu-Boumendil, *Microscopie électronique. Principes et méthodes de préparation*, Inserm, Paris, 1988.
- [29] R. Martoja, M. Martoja-Pearson, *Initiation aux techniques de l'histologie animale*, Masson et Cie, Paris, 1967.
- [30] L. Vollrath, The pineal organ, in: A. Oksche, L. Vollrath (Eds.), *Handbuch der mikroskopischen anatomie des menschen*, VI/7, Springer Verlag, Berlin, 1981.
- [31] M.N. Sheridan, R.J. Reiter, Observations on the pineal system in the hamster. I- Relations of the superficial and deep pineal to the epithalamus, *J. Morphol.* 131 (1970) 153–161.
- [32] M.N. Sheridan, M.D. Rollag, Development and melatonin content of the deep pineal gland in the Syrian hamster, *Am. J. Anat.* 168 (1983) 145–156.
- [33] H.J. Romijn, Structure and innervation of the pineal gland of the rabbit *Oryctolagus cuniculus* (L). II. Electron microscopic investigation of the pinealocytes, *Z. Zellforsch.* 141 (1973) 545–560.
- [34] P. Pévet, J.A. Kappers, E. Nevo, The pineal gland of the mole-rat (*Spalax ehrenbergi*, Nehring). I. The fine structure of pinealocytes, *Cell. Tissue Res.* 22174 (1) (1976) 1–24.
- [35] R. Miline, Different populations of pinealocytes in the pineal gland of the mole rat (*Spalax leucodon*, Nordmann), *Prog. Brain Res.* 52 (1979) 207–221.
- [36] P. Pévet, J.A. Kappers, A.M. Vouïte, The pineal gland of nocturnal mammals. I. The pinealocytes of the bat (*Nyctalus noctula*, Schreber), *J. Neural. Transm.* 4 (1) (1977) 47–68.
- [37] M. Karasek, J.T. Hansen, Ultrastructure of the pineal gland of the fox, *Am. J. Anat.* 163 (1982) 257–267.
- [38] A. Dekar, M. Bendjelloul, La glande pinéale de la gerbille. Étude ultrastructurale en fonction de la photopériode, *Bull. Soc. Zool. FR.* 127 (2) (2002) 103–118.
- [39] P. Pévet, On the presence of different populations of pinealocytes in the mammalian pineal gland, *J. Neural. Transm.* 40 (1977) 289–304.
- [40] P. Pévet, M. Karasek, Are the pineal active compounds of mammals proteinaceous in nature? An ultrastructural contribution, *Acta Med. Pol.* 18 (1977) 351–355.
- [41] P. Pévet, P. Racey, The pineal gland of nocturnal mammals. II. The ultrastructure of the pipistrelle bat (*Pipistrellus pipistrellus* L.). Presence of two populations of pinealocytes, *Cell. Tissue Res.* 216 (1981) 253–271.
- [42] M. Karasek, E.C. Hurlbut, J.T. Hansen, R.J. Reiter, Ultrastructure of pinealocytes of the Kangaroo rat (*Dipodomys ordi*), *Cell. Tissue Res.* 226 (1982) 167–175.
- [43] M. Karasek, M. Pavlikowski, J. Ariens Kappers, H. Stepien, Influence of castration followed by administration of LH-RH on ultrastructure of rat pinealocytes, *Endocrinol. Exp.* 15 (1976) 17–34.
- [44] S. Matsushima, Y. Morisawa, L.J. Petteborg, J.W. Zeagler, R.J. Reiter, Ultrastructure of pinealocytes of the cotton rat, *Sigmodon hispidus*, *Cell. Tissue Res.* 206 (1979) 407–416.
- [45] W. Bondareff, Electron microscope study of the pineal body in aged rats, *J. Gerontol.* 20 (1965) 321–327.
- [46] J. Boya, J.L. Calvo, Structure and ultrastructure of the aging rat pineal gland, *J. Pineal Res.* 1 (1984) 83–89.
- [47] J. Swietoslavski, The age-related quantitative ultrastructural changes in pinealocytes of gerbils, *Neuroendocrinol. Lett.* 20 (1999) 391–396.
- [48] J.R. Johnson, Fine structural alterations in the aging rat pineal gland, *Exp. Aging Res.* 6 (1980) 189–210.
- [49] W. Humbert, P. Pévet, The pineal gland of aging rat: calcium localization and variation of number of pinealocytes, *J. Pineal. Res.* 18 (1995) 32–40.
- [50] J. Feser, J. Tyler, Chromatin structure as a mediator of aging, *FEBS Lett.* 385 (13) (2011) 2041–2048.
- [51] P. Scaffidi, T. Misteli, Lamin, A-dependent nuclear defects in human aging, *Science* 312 (2006) 1059–1063.
- [52] T.S. King, M. Karasek, L.J. Petteborg, J.T. Hansen, R.J. Reiter, Effects of advancing age on the ultrastructure of pinealocytes in the male white-

- footed mouse (*Peromyscus leucopus*), *J. Exp. Zool.* 224 (2) (1982) 127–134.
- [53] D.J. Allen, L.J.A. Didio, E.R. Gentry, O. Ohtani, The aged rat pineal gland as revealed in SEM and TM, *Age* 5 (1982) 119–126.
- [54] R. Krstić, Pineal calcification: its mechanism and significance, *J. Neural. Transm. Suppl.* 21 (1986) 415–432.
- [55] B. Cozzi et, B. Ferrandi, The pineal gland of the horse. Morphological and histochemical results (with notes on the donkey and mule pineal), *Basic Appl. Histochem.* 28 (1) (1984) 81–90.
- [56] H.A. Schmid, P.J. Requentina, G.F. Oxenkrug, W. Sturner, Calcium, calcification, and melatonin biosynthesis in the human pineal gland: a postmortem study into age-related factors, *J. Pineal. Res.* 16 (4) (1994) 178–183.
- [57] W.B. Quay, Pineal chemistry, in: *Cellular and physiological mechanisms*, Thomas Publishing, Springfield, 1974.
- [58] R.J. Reiter, M.G. Welsh, G.M. Vaughan, Age related changes in the intact and sympathetically denervated gerbil pineal gland, *Am. J. Anat.* 146 (1976) 427–432.
- [59] M.G. Welsh et, R.J. Reiter, The pineal gland of the gerbil *Meriones unguiculatus*. An ultrastructural study, *Cell. Tissue Res.* 193 (1978) 323–336.
- [60] J. Milin, Stress reactive response of the gerbil pineal gland: concretion genesis, *General Comp. Endocrinol.* 110 (1998) 237–251.
- [61] A. Lukaszuk et, R.J. Reiter, Histophysiological evidence for secretion of polypeptides by the pineal gland, *Am. J. Anat.* 143 (1975) 451–464.
- [62] J.L. Japha, T.J. Eder, E.D. Goldsmith, Calcified inclusions in the superficial pineal gland of the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*, *Acta Anat.* 94 (1976) 533–534.
- [63] W. Humbert, P. Pévet, Calcium content and concretions of pineal glands of young and old rats. A scanning and X-ray microanalytical study, *Cell Tissue Res.* 263 (1991) 593–596.
- [64] S. Koshy, S.K. Vettivel, Varying appearances of calcification in human pineal gland: a light microscopic study, *J. Anat. Soc. India* 50 (1) (2001) 17–18.
- [65] A.L. Leninger, Mitochondria and calcium ion transport, *Biochem. J.* 119 (1970) 129–138.
- [66] M.J. Glimcher, Molecular biology of mineralized tissues with particular reference to bone, *Rev. Mod. Phys.* 31 (1959) 359–393.
- [67] R.E. Wuthier, A review of primary mechanism of endochondral calcification with special emphasis on role of cells, mitochondria and matrix vesicles, *Clin. Orthop.* 169 (1982) 219–242.