

D. Observation

B. Morales-Nin, J. Panfili

Il existe pratiquement autant de techniques d'observation des PC que de techniques de préparation, allant des plus simples jusqu'aux plus complexes. Le chercheur devra donc en sélectionner une parmi toute cette gamme en fonction de l'aptitude de la technique à répondre aux objectifs de l'étude. Comme pour le choix d'une technique de préparation, le choix d'une méthode d'observation dépend du temps requis et disponible pour obtenir les résultats escomptés, mais aussi des coûts expérimentaux. Par exemple, la standardisation des conditions d'éclairage des échantillons devient obligatoire pour l'utilisation de l'analyse d'images (Mosegaard *et al.*, 1998) : une description précise de ces conditions est absolument indispensable lorsque l'on désire par la suite comparer les propriétés optiques des PC. Les marques de croissance peuvent être révélées de façon variable en fonction de la source de lumière utilisée.

Dans ce chapitre, nous présentons quelques-unes des techniques d'observation les plus couramment employées dans le cadre des études de sclérochronologie.

1. Microscopie photonique

1.1. Faible grossissement (loupe binoculaire)

Les grandes pièces du squelette, comme les *cleithra* des Esocidae, peuvent être observées et mesurées sans avoir recours à un quelconque grossissement. L'âge peut être estimé à l'œil nu, même sur le terrain, et pour des individus ayant jusqu'à 30 ans (Casselman, 1974). Cependant, les marques de croissance sont rarement assez larges pour être observées avec exactitude à l'œil nu et il est assez fréquent de les regarder à un faible grossissement. À cette échelle, seules les marques saisonnières et annuelles sont visibles. Cette méthode d'observation est certainement la moins coûteuse et la plus rapide, permettant en outre d'observer un grand nombre d'échantillons dans un minimum de temps. La gamme habituelle de grossissements s'étend de 1× à environ 100×.

1.1.1. Pièce entière

L'observation de la PC entière est particulièrement adaptée pour les structures relativement fines et translucides comme les écailles, les os operculaires, les *cleithra* et certains otolithes. Pour les poissons possédant des PC épaisses qui sont trop denses pour que les marques de croissance les plus internes soient visualisées, il est nécessaire de les préparer en coupes (chap. VIII.C.2.3).

(40-60° C) ou avec de la résine polyester, et les PC hydrophiles (e.g. coupes fines d'épines) avec du Permout®.

1.1.4. Éclairage

Deux voies peuvent être employées pour éclairer les surfaces à observer. La lumière passe soit directement à travers la PC (lumière transmise) ou elle est projetée sur la surface par le dessus (lumière réfléchie). La lumière réfléchie est souvent utilisée pour observer les marques de croissance saisonnières tandis que, pour l'observation des microstructures (e.g. journalières) des otolithes, la lumière transmise est préférée. Quoiqu'il en soit, des essais préalables de comparaison des sources de lumière, transmise et réfléchie, doivent être effectués avant d'utiliser l'une ou l'autre en routine pour lire les marques de croissance saisonnières (e.g. pour les os). L'aspect de ces accroissements saisonniers va dépendre du type d'éclairage employé (fig. VIII.D.1) : sous une lumière transmise, les marques translucides sont lumineuses et les marques opaques sont sombres tandis que, sous une lumière réfléchie, les marques translucides sont sombres et les opaques lumineuses. Le fait que les marques de croissance soient décrites comme « lumineuses » ou « sombres », en fonction du type d'éclairage, peut conduire à une certaine confusion et, pour cette raison, les termes « opaque » et « translucide » devraient toujours être utilisés (Casselmann, 1974, 1983 ; Williams & Bedford, 1974).

1.1.4.1. Lumière transmise (fig. VIII.D.1a, b)

Avec une lumière transmise, il est nécessaire d'employer un récipient transparent si la PC observée doit être immergée dans un liquide éclaircissant. Deux types d'éclairage sont également disponibles et doivent être testés : un éclairage transmis direct (fig. VIII.D.1a) ou un éclairage en diascopie (fig. VIII.D.1b). Lorsque des coupes épaisses de PC sont observées, la meilleure image est obtenue lorsque la base de la PC est illuminée par le côté avec un éclairage à fibres optiques et que la surface est cachée de la lumière. L'ombre en surface oblige la lumière à passer par le niveau inférieur de la coupe et à ressortir sous la surface observée, augmentant de la sorte le contraste entre les zones opaques et translucides. La luminosité et le contraste à la surface d'une PC peuvent être contrôlés en faisant varier la position des fibres optiques (Estep *et al.*, 1995).

1.1.4.2. Lumière réfléchie (fig. VIII.D.1c)

La qualité de l'observation est améliorée en utilisant un récipient possédant un fond noir. La source de lumière incidente doit être soit latérale, soit en provenance du dessus de la préparation examinée. L'utilisation d'une lumière réfléchie nécessite l'emploi d'un milieu éclaircissant pour éviter une distorsion de la lumière en surface. Une bonne orientation de la source lumineuse est particulièrement importante et doit être réglée pour obtenir le meilleur contraste entre les

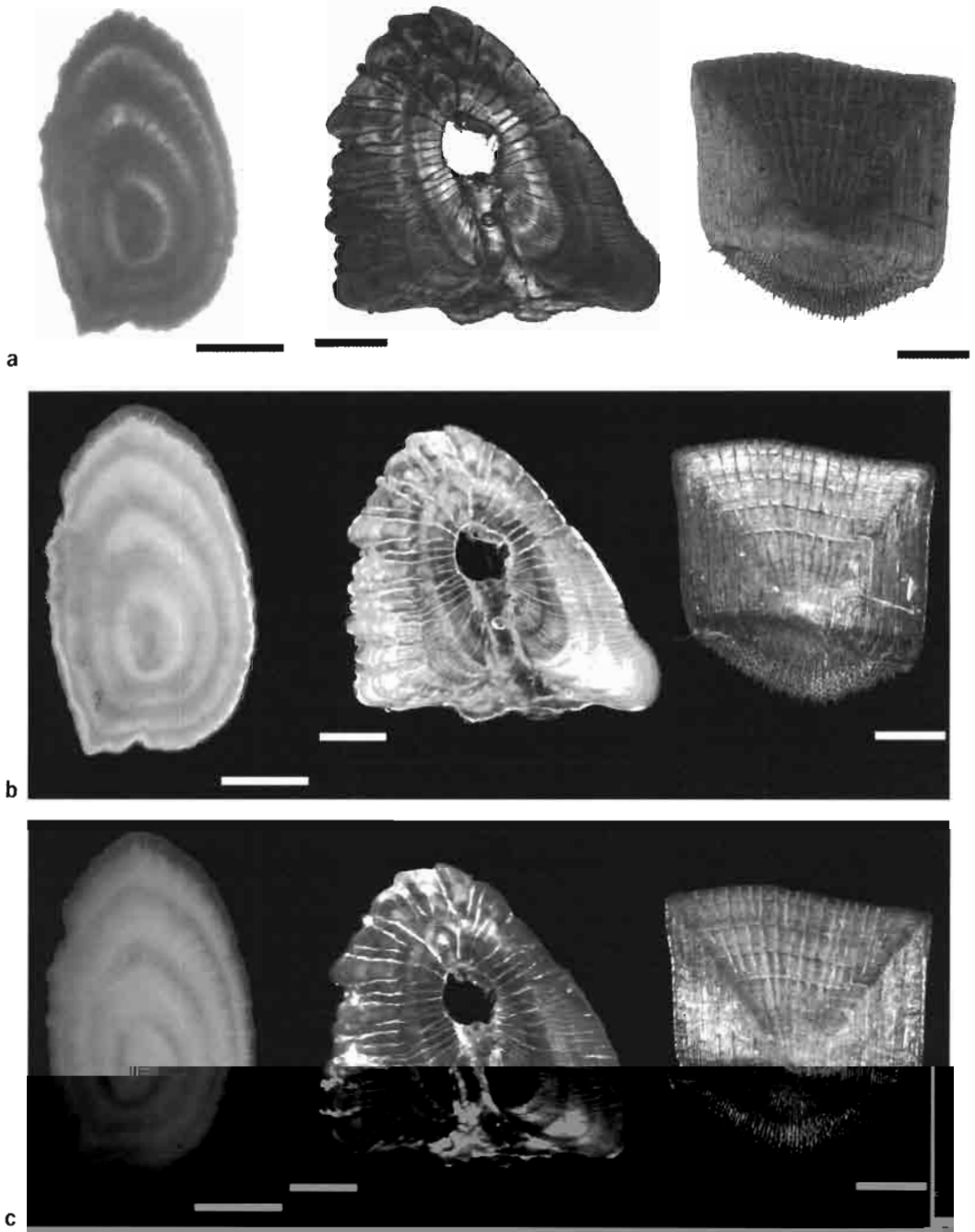


Figure VIII.D.1 - De gauche à droite, otolithe entier de *Pleuronectes platessa*, coupe d'épine de *Pangassius hypophthalmus* et écaille de *Dicentrarchus labrax*, observés en lumière transmise directe (a), en lumière transmise en diascopie (b) et en lumière réfléchie sur fond noir (c). Échelle = 200 μm (photos J. Panfil).

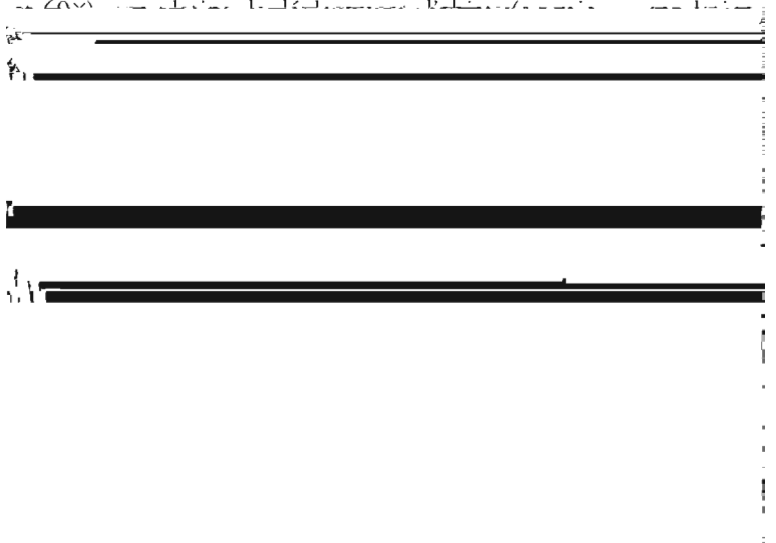
marques de croissance. Il est toutefois préférable d'utiliser une source de lumière froide pour les observations en lumière incidente afin de minimiser l'évaporation du liquide éclaircissant : les fibres optiques sur support souple couplées à une lampe de forte puissance sont certainement le meilleur moyen.

1.1.4.3. Projecteur de profil

Le projecteur de profil est surtout utilisé pour la lecture des écailles. Au début des années vingt, le projecteur de profil a été développé pour projeter des images grossies des écailles sur un verre dépoli. Ceci a ensuite été copié dans de nombreux laboratoires et était disponible dans le commerce (Carlander, 1987). Ce genre d'appareil permet d'effectuer des mesures manuelles des distances sur le verre dépoli. De nos jours, les systèmes informatiques d'analyse d'images sont employés dans le même but dans les laboratoires à haute technologie les plus récents mais avec de meilleures performances et un plus grand rendement.

1.2. Fort grossissement (microscope photonique)

Le fort grossissement au microscope photonique est utilisé principalement pour examiner les microstructures des otolithes, pour interpréter les micro-accroissements primaires et, quelques fois, pour observer la structure interne des autres PC (e.g. constituants cellulaires et extracellulaires des os). Comme pour la loupe binoculaire, différentes sources de lumière peuvent être employées : même si la lumière transmise est la plus couramment utilisée, d'autres types d'éclairage existent, comme la lumière réfléchie, la lumière polarisée, le contraste de phase et la fluorescence. À ce niveau, l'observateur doit faire un choix après des essais comparatifs de ces différents éclairages. Les observations microstructurales sont meilleures avec un microscope photonique doté d'un équipement minimal (Campana, 1992) : deux oculaires dont l'un au moins est réglable à la vue, des objectifs avec des grossissements de 20×, 40× et 100× (plus d'autres, par exemple 10×



ressant qui illustre les limites des caractéristiques des principaux types d'objectif : l'ouverture numérique de l'objectif contrôle finalement à la fois le grossissement et la résolution obtenus, et cette dernière augmente lorsque l'ouverture diminue. Cependant, la limite de résolution réelle d'un microscope photonique parfaitement au point est inférieure à la limite théorique (autour de $0,3 \mu\text{m}$) et empêche souvent, de ce fait, l'observation des plus petites structures, i.e. les micro-accroissements des otolithes inférieurs à $1 \mu\text{m}$ (Campana, 1987 ; Morales-Nin, 1988; Campana, 1992). Dans ce cas, l'utilisation du MEB devient obligatoire. Les possibilités de grossissement sont limitées par le matériel disponible. L'objectif maximal qui peut être utilisé est normalement $100\times$ (avec ou sans huile d'immersion) et, avec une bonne combinaison d'oculaires et de bagues intermédiaires, le grossissement maximal utile atteint $1000\times$ - $1250\times$ (Campana, 1992).

1.2.2. Objectifs à immersion vs objectifs à sec

Les objectifs de faible puissance sont des objectifs à sec (jusqu'à $60\times$) tandis que les objectifs à immersion sont utilisés pour les forts grossissements. En biologie, la plupart des utilisateurs pensent que le grossissement maximal peut être seulement obtenu avec un objectif à immersion de $100\times$. Cependant, il existe des objectifs à sec $100\times$ qui sont utilisés en géologie et qui sont donc particulièrement appropriés pour les études de sclérochronologie. L'un de leurs principaux avantages est de pouvoir préserver l'état original de la préparation de la PC (e.g. lames minces) car il n'est pas nécessaire de la nettoyer à la suite de l'observation. Lorsque l'on utilise des objectifs à immersion et de l'huile d'immersion, la préparation doit ensuite être nettoyée avec une solution d'éther-alcool (50:50). Nous recommandons donc dans l'absolu l'utilisation d'objectifs à sec, quel que soit le type de grossissement employé.

1.2.3. Éclairage

Une source d'éclairage optimisée a une influence très importante sur la qualité de l'image visualisée (Campana, 1992), quels que soient les oculaires et les objectifs employés. Toutes les étapes de mise au point de l'éclairage en microscopie photonique sont identiques à chaque fois : elles incluent le centrage de la source lumineuse, la focalisation de la lumière sur le plan d'observation avec le condensateur, et l'ajustement des diaphragmes de champ et d'ouverture. Un diaphragme d'ouverture ajusté correctement va augmenter les contrastes, la profondeur de champ et la résolution. Tous ces paramètres doivent être vérifiés au début de l'examen d'une série d'échantillons, mais les mêmes paramètres doivent être utilisés entre les différentes séries d'échantillons dans le but de standardiser le processus.

1.2.3.1. Filtres

Les lentilles achromatiques tendent à améliorer la qualité des images lorsque le diaphragme d'ouverture est fermé et lorsqu'une lumière monochromatique est utilisée. Le changement de la qualité d'une image peut être attribué au fait que les lentilles ne sont pas totalement corrigées pour toutes les longueurs d'onde de la lumière artificielle ou pour la totalité du champ de vision. La lumière verte est la plus fréquemment utilisée. Un filtre de couleur faisant écran à la source de lumière peut augmenter la limite de résolution de 15 à 20 % (Campana, 1992). Les filtres de polarisation améliorent l'observation des marques de croissance et sont aussi recommandés (chap. VIII.D.1.3).

1.2.3.2. Microscopie confocale

La microscopie confocale, également appelée microscopie laser à balayage (MLB), permet l'observation de sections confocales (simple plan focal d'épaisseur avoisinant 0,5 μm) dans les couches internes d'échantillons épais. Cette technique est utilisée pour examiner la morphologie des PC, principalement des otolithes, et les microcroissements chez les larves et les juvéniles, dans le but d'évaluer la croissance et le choix d'un plan de coupe (Lagardère *et al.*, 1995). Comparée à la microscopie photonique conventionnelle, les avantages de la MLB incluent simultanément les mesures en 3D et l'augmentation du contraste et du niveau de résolution pour certaines applications. La MLB peut opérer en mode d'épi-illumination (confocale) et en mode de transmission. Les observations faites en mode épi-illuminé dépendent de l'autofluorescence de l'otolithe. Cette technique peut aussi être utilisée pour détecter les marques de fluorescence sous la surface d'un otolithe. Cette technique confocale ne peut cependant pas permettre de délimiter le dépôt des marques de croissance dans les otolithes car elle dépend de la fluorescence des spécimens étudiés. L'examen des microcroissements des otolithes en MLB nécessite l'utilisation d'un mode transmis.

1.2.3.3. Lumière transmise vs lumière réfléchie

En microscopie photonique, il existe deux possibilités d'éclairage : la plus fréquemment utilisée est la lumière transmise, qui permet une observation à travers une faible profondeur de champ, et la moins utilisée est la lumière réfléchie (également appelée épi-réfléchie), qui ne permet que l'observation de surface. Ce dernier type d'éclairage a été développé à l'origine pour les études de géologie et nécessite un équipement spécial sur un microscope standard. Ceci permet au faisceau de lumière de passer à travers les lentilles des objectifs, de se réfléchir sur la surface et de retraverser les lentilles pour générer une image. Cette technique est particulièrement utile pour observer les surfaces après des préparations spéciales, comme le ponçage et/ou le polissage, de façon à contrôler leur qualité. Une application possible est le contrôle

de l'attaque acide des surfaces des PC avant un passage au MEB. Néanmoins, le contrôle de cette attaque acide peut être fait directement sous le microscope (chap. VIII.C.2.6). Il est également possible de combiner les deux sources de lumière, transmise et réfléchie, lorsque cela est nécessaire.

1.3. Lumière polarisée

La lumière polarisée est obtenue au moyen de deux filtres de polarisation et de lumière transmise. Le premier filtre (le polariseur) est placé entre la source de lumière et la préparation, et le deuxième (l'analyseur) entre la préparation et les oculaires. La position relative de ces deux filtres peut être ajustée et offre la possibilité de déceler les différents états de polarisation de la lumière à travers la PC préparée. Ceci peut révéler certaines structures qui ne sont pas visibles sous une lumière normale. Les otolithes ou les os ont eux-mêmes des propriétés de polarisation. Les otolithes sont réfringents à la lumière polarisée et cette caractéristique permet de les visualiser même chez les très petits individus, comme les larves de quelques millimètres de longueur (chap. VIII.B.3.2). La lumière polarisée est nécessaire pour observer certaines marques de croissance des otolithes, et particulièrement les microstructures situées près du bord (Mosegaard *et al.*, 1998). Pour l'examen structural des os, la lumière polarisée est utile pour révéler l'orientation des fibres de collagène, par exemple : la matrice osseuse à fibres enchevêtrées ou la matrice osseuse à fibres parallèles ou, encore, l'os lamellaire (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990) (chap. II.C.1.1.2).

1.4. Lumière ultraviolette

La lumière ultraviolette (UV) est seulement utilisée pour révéler les marques de fluorescences incorporées dans les PC (chap. IV.A.1.2.1). L'équipement nécessaire à la production de lumière UV est en général spécialement adapté pour les microscopes photoniques, ce qui malheureusement limite son utilisation à l'observation de petites préparations. Le chemin emprunté par le faisceau de lumière est le même que celui de la lumière réfléchie (chap. VIII.D.1.2.3.3), arrivant par le dessus et passant à travers l'objectif. Le nom de « lumière épifluorescente » est aussi donné à ce type d'éclairage. L'utilisateur doit vérifier la compatibilité de la source d'UV et des objectifs du microscope. En fonction de la substance fluorescente révélée, des filtres spécifiques peuvent être nécessaires. Le tableau IV.A.1 résume les caractéristiques des marqueurs fluorescents, leurs longueurs d'onde d'excitation et de fluorescence, leur lumière d'excitation et les filtres requis. Dans le but de visualiser à la fois les marques de fluorescence et les marques de croissance des PC, il est possible d'utiliser simultanément l'épifluorescence et la lumière transmise (fig. IV.A.2).

2. Microscopie électronique

Comme son nom l'indique, la microscopie électronique utilise les électrons à la place des photons de la microscopie photonique et offre ainsi la possibilité de grossissements et de résolutions nettement plus élevés. Deux principaux types de microscope sont disponibles : le microscope électronique à balayage (MEB) et le microscope électronique à transmission (MET). La plupart des études de sclérochronologie utilisent seulement le MEB. Pour cette raison, nous ne décrivons ici que l'utilisation et les diverses recommandations pour le MEB, et le lecteur pourra se référer aux nombreux ouvrages et articles spécialisés décrivant l'utilisation du MET en cas de nécessité. Le MEB se situe à une position intermédiaire entre le microscope photonique et le MET en termes de résolution et d'information sur l'image observée. Son utilisation peut également être rapprochée de la microscopie épi-réfléchie (chap. VIII.D.1.2.3.3).

2.1. MEB

Le MEB est un outil d'observation de la topographie de surface, très répandu dans les études sur les otolithes. Ce type d'instrument offre la possibilité d'augmenter la profondeur de champ d'au moins 300 fois par rapport au meilleur microscope photonique, comme le montre la plupart des superbes images 3D qu'il fournit. De plus, les interactions entre le faisceau d'électrons et les échantillons sous le MEB peuvent donner des informations utiles sur la composition chimique de leur surface, tout comme sur leurs caractéristiques cristallographiques, magnétiques et électriques. Pour les analyses microchimiques, le MEB est couplé à une microsonde électronique à énergie dispersive (chap. VII.G.1).

2.1.1. Caractéristiques du MEB

Le faisceau d'électrons utilisé pour bombarder l'échantillon analysé est accéléré avec un voltage de 1 à 30 kilovolts. Les interactions entre ce faisceau et l'échantillon créent des micro-courants qui sont utilisés pour générer une image qui peut donner trois types de résultat :

- certains électrons primaires, dépendant du voltage d'accélération employé, pénètrent dans un corps solide jusqu'à une profondeur de 10 micromètres. Leur trajectoire varie et ils perdent d'autant plus d'énergie qu'ils pénètrent profondément dans l'échantillon ;
- certains électrons primaires interagissent avec les atomes des couches les plus superficielles et il existe un échange momentané (mais pas un échange d'énergie) provoquant une rétrodiffusion des électrons avec un angle très large ; ces derniers sont ensuite effectivement réfléchis à la surface de l'échantillon. Ces électrons primaires réfléchis de façon élastique sont encore appelés « électrons rétrodiffusés » ;
- certains électrons primaires interagissent avec les atomes hôtes et le résultat de ces collisions entraîne l'apparition « d'électrons secondaires » qui naissent au fur et à mesure de la pénétration du faisceau.

cette étape (chap. VIII.D.1.1.4.2). Dans le but d'éliminer tout matériel étranger accroché à l'otolithe, la préparation doit être ensuite nettoyée dans un bain à ultrasons dans de l'eau déionisée pendant 15 à 30 secondes. Après nettoyage, la coupe doit être attaquée pour révéler son ultrastructure. Les agents chimiques les plus fréquemment utilisés pour une attaque acide sont le HCl dilué (2 %, pH 2,0-5,0) et l'EDTA (pH= 7,2-7,6) (chap. VIII.C.2.6). Le temps d'attaque (1 à 10 min) dépend de l'espèce étudiée ainsi que de la température de la pièce. Des essais préalables doivent donc être réalisés pour déterminer le temps requis pour obtenir de bons résultats (chap. VIII.C.2.6).

Pour les études de morphologie, la PC entière est observée et seul un nettoyage préalable est nécessaire avant les prochaines étapes de préparation pour le MEB.

Les échantillons doivent être ensuite séchés à 30 °C pendant 6 à 8 heures et laissés à l'abri de la poussière. Ils sont alors attachés à des plots porte-objet, spéciaux pour le MEB, avec de la peinture au carborundum, de la colle thermofusible ou du ruban adhésif double-face. Un pont de colle argentée doit être déposé entre la surface de la préparation et le plot métallique pour éviter la création de charges électrostatiques à la surface de la préparation pendant l'observation. La surface de la section est alors métallisée avec de l'or (100 angströms pour une observation topographique) ou du carbone (10-50 angströms pour une analyse microchimique) avant l'observation finale au MEB.

3. Microradiographie (F.J. Meunier)

Dans certains cas, la meilleure technique pour visualiser les marques de croissance des os est la microradiographie de sections polies (fig. VIII.D.2) (Cailliet *et al.*, 1983 ; Casselman, 1983 ; Gruber & Stout, 1983 ; Yudin & Cailliet, 1990 ; Boujard & Meunier, 1991 ; Francis & Mulligan, 1998). Le principe de cette technique est le même que celui utilisé pour la radiographie médicale, mais nécessite bien sûr un appareil adapté à l'observation de petits objets calcifiés, comme par exemple les coupes poncées (Boivin & Baud, 1984, *inter alia*). Les coupes (chap. VIII.C.2.3.1) sont délicatement déposées sur des films radiographiques à haute résolution (Kodak SO643 ou équivalent) (fig. VIII.D.2a) puis exposées alors dans un générateur à rayons X qui produit des rayons de 10-30 kV à 10-15 milliampères, en fonction des différents réglages. Les films sont développés avec un révélateur spécial pour films de type HRP, lavés et fixés. Ils sont alors observés directement avec une loupe binoculaire ou un microscope après un simple montage entre deux lames de microscopie (fig. VIII.D.2b).

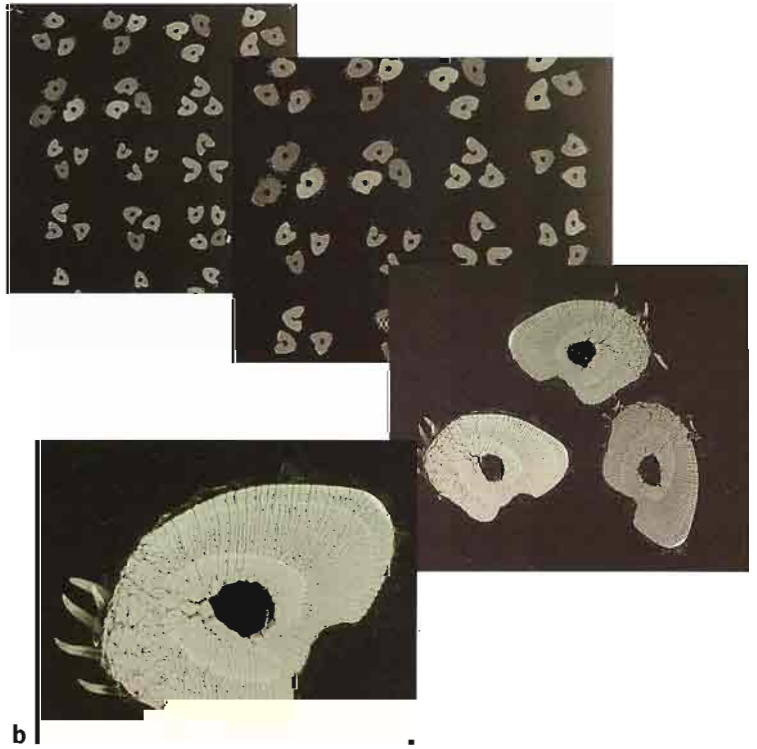


Figure VIII.D.2 - Microradiographie de coupes de rayons de nageoire (*Hoplosternum littorale*).
a) Dans une chambre noire, les coupes de rayons de nageoire (flèche rouge) sont déposées sur un film photographique (flèche jaune) avant d'être soumise aux rayons X. b) Résultats de la